



Maria Pia Vaz do Rego Pacheco Silva

Licenciatura Ciências da Engenharia Biomédica

**Determinação da concentração de mercúrio, e
outros elementos traço, em tecidos de
peixe-zebra (*Danio rerio*)**

Dissertação para obtenção do Grau de
Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Professor Doutor Mauro Guerra,
Prof.Auxiliar Convidado, FCT-UNL

Co-orientadores: Professor Doutor José Paulo Santos,
Prof.Associado com Agregação, FCT-UNL
Professor Doutor Mário Diniz, Prof. Auxiliar,
FCT-UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2016

Determinação da concentração de mercúrio, e outros elementos traço, em tecidos de peixe-zebra (*Danio rerio*)

Copyright © Maria Pia Vaz do Rego Pacheco Silva, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

"No great discover was ever made without a bold guess."

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao meu orientador Professor Doutor Mauro Guerra por todo o apoio, pela disponibilidade, ensinamentos fundamentais para a concretização deste trabalho e sobretudo pela confiança depositada em mim. Ao meu co-orientador Professor Doutor Mário Diniz por todo o apoio e disponibilidade prestada desde o primeiro dia imprescindíveis para a realização deste trabalho. Ao meu co-orientador Professor Doutor José Paulo Santos pela disponibilidade, por todo o apoio e incentivo dado. Um sincero obrigada a todos pela possibilidade de realizar este trabalho e contribuição para o mesmo.

Ao Biotério do departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, ao Laboratório de instrumentação, Engenharia Biomédica e Física da Radiação (LIBPhys-UNL) do departamento de Física da FCT-UNL e ao Laboratório de Bioquímica Ambiental/Toxicologia do departamento de Química da FCT-UNL por todo o material necessário para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente, à Ana Magalhães, Sara Coutinho e Catarina Fonseca por todo o apoio e amizade partilhada. À Professora Doutora Sofia Pessanha por toda a ajuda e disponibilidade no laboratório.

A todos os meus amigos da faculdade por todos os momentos partilhados, particularmente à Sara, Mimi, Ana Pepe, Mariana, Gabi, Ritinha e Mafalda. Obrigada pela amizade, por todo o apoio e carinho desde o primeiro dia. Fizeram de Lisboa a minha segunda casa.

Aos meus colegas de equipa do corfebol da NOVA, por todo o companheirismo mostrado e amizade.

Aos meus amigos de longa data, que à distância estiveram sempre presentes, em especial ao Luis, à Inês e à Sofia.

Ao João Sousa por todo o apoio, carinho e paciência ao longo destes cinco anos e por nunca me ter deixado desistir.

Um agradecimento muito especial aos meus pais e às minhas irmãs, que apesar da distância, estiveram sempre presentes nas piores e melhores alturas transmitindo todo o apoio necessário e amor. Sem eles este feito não seria possível.

A todos o meu sincero obrigada.

RESUMO

O mercúrio (Hg) é um elemento metálico que ocorre naturalmente no ambiente, sendo muito tóxico para os organismos vivos e podendo ter impacto na saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o Hg é atualmente uma das dez maiores preocupações de saúde pública. A intoxicação por este elemento está associada a modificações no ADN e a diversas patologias como a cegueira, défices neurológicos, defeitos no desenvolvimento e, em certos casos, pode resultar em morte.

Enquanto modelo biológico, o peixe-zebra possui uma ampla gama de informações disponíveis, incluindo a sequência total do genoma que apresenta uma homologia significativa com o genoma humano, apresentando uma semelhança aproximadamente de 75%. O objetivo deste estudo foi determinar a concentração de Hg e outros elementos traço (ex: ferro), nos tecidos/órgãos alvo, passíveis de serem bioacumulados. Esta informação permite-nos ter algumas indicações dos processos fisiológicos de intoxicação e acumulação por Hg. Para avaliar os efeitos do Hg, 34 peixes-zebra (*Danio rerio*) foram expostos durante 7 dias a uma concentração pré definida de HgCl₂ (100 µg/L, 200 µg/L e 400 µg/L) e um tanque de controlo (sem contaminação de Hg), num ensaio semi-estático, onde a cada 24 h se procedeu à renovação do meio.

Após o período de exposição, as amostras foram analisadas por Micro Fluorescência de raios-X por dispersão em energia (µ-EDXRF), através do espectrómetro M4 Tornado™ da Bruker, que permite a análise de uma pequena região de 25 µm, através de um micro-feixe de raios-X com capilares óticos. Esta técnica permite uma análise multielementar e mapas bidimensionais da distribuição elementar e a quantificação das concentrações de cada órgão do peixe em específico. Algumas amostras foram analisadas por Espectroscopia de Emissão Atómica por Plasma Induzido (ICP-AES) de modo a comparar os resultados.

Foram avaliados os efeitos do stress oxidativo causado pela exposição do Hg através da análise de enzimas antioxidantes (catalase, glutathione-S-transferase) e os danos ao nível das membranas celulares através da determinação da peroxidação lipídica.

Palavras-chave: Hg, bioacumulação, *Danio rerio*, µ-EDXRF, EDXRF, ICP-AES.

ABSTRACT

Mercury (Hg) is a metal element that occurs naturally in the environment, being very toxic to living organisms and which may have a negative impact on public health. According to the World Health Organization, Hg is one of the 10 chemicals of major public health concern Hg exposure is associated with DNA damage and various diseases such as blindness, neurological disorders, defects in development and, in some cases, can result in death.

As a biological model system, zebrafish has a wide range of information available, including the total genome sequence which presents significant homology to the human genome, approximately 75% similarity. The aim of this study was to analyze and determine the target tissue/organs of zebrafish where Hg and other trace elements (ex: iron) have been bioaccumulated. This information allows us to shed light in the physiological process of Hg poisoning. To assess the effects of Hg in animals, 34 adult zebrafishes (*Danio rerio*) were exposed for 7 days to predetermined concentrations of HgCl₂ (100 µg/L, 200 µg/L and 400 µg/L) and a control tank (no Hg exposure), in a semi-static assay where every 24 h the media in the tanks was renewed and contaminated again.

Zebrafish tissue samples were analyzed by Micro Energy Dispersive X-ray Fluorescence Technique (µ-EDXRF) using the M4 Tornado™ spectrometer by Bruker, which features a polycapillary X-ray lens allowing a beamsize of only 25 µm. This technique allows us to have a multi elemental analysis as well as bidimensional maps of the elemental distribution within the fish organs and also allows quantification of the concentrations of each organ of the fish. Some samples were also analyzed by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) in order to compare the results.

The effects of the oxidative stress caused by exposure to Hg were evaluated through stress biomarkers (catalase, glutathione S-transferase) and lipid peroxidation as indicators of cellular damage.

Keywords: Hg, bioaccumulation, *Danio rerio*, µ-EDXRF, EDXRF, ICP-AES.

CONTEÚDO

Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xix
Lista de acrónimos e siglas	xxi
Lista de símbolos	xxiii
1 Introdução	1
2 Mercúrio e toxicidade	5
2.1 Mercúrio (Hg)	5
2.1.1 Principais formas de mercúrio	5
2.1.2 Principais vias de exposição	6
2.1.3 Interações no organismo	7
2.1.4 Toxicidade	8
2.2 Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)	9
2.2.1 Modelo biológico	9
2.2.2 Anatomia	10
2.2.3 Acumulação de Hg nos tecidos alvos	12
2.3 Biomarcadores	12
2.3.1 Enzimas antioxidantes	13
2.3.2 Peroxidação Lipídica como marcador de stress oxidativo	14
2.3.3 Vitelogenina (VTG)	14
3 Princípios Físicos e Técnicas	15
3.1 Técnica de Fluorescência de Raios-X (XRF)	15
3.2 Produção de raios-X	15
3.3 Interação com a matéria	17
3.3.1 Absorção fotoelétrica	18
3.3.2 Dispersão Rayleigh	18
3.3.3 Dispersão Compton	19
3.4 Fluorescência de raios-X por Dispersão em Energia (EDXRF)	19
3.4.1 μ -EDXRF	20

3.4.2	EDXRF com geometria triaxial	21
3.5	Limite de detecção	22
3.6	Espectro caraterístico	23
4	Materiais e Métodos	25
4.1	Bioensaio de exposição	25
4.2	Preparação das amostras	26
4.2.1	Análise por μ -EDXRF e EDXRF	26
4.2.2	Análise por ICP-AES	27
4.3	Espectrómetro de μ -EDXRF	27
4.4	Espectrómetro de EDXRF com geometria triaxial	28
4.5	Processo de quantificação	28
4.6	Incertezas associadas	29
4.7	Análise de biomarcadores	29
4.7.1	Extração de proteínas	29
4.7.2	Glutathione-S-Transferase (GST)	30
4.7.3	Catalase (CAT)	30
4.7.4	Ensaio de Lipoperoxidação	30
4.7.5	Determinação da Vitelogenina (VTG)	30
4.7.6	Análise Estatística	30
5	Análise e Discussão de Resultados	31
5.1	Análise Qualitativa	31
5.1.1	Distribuição Elementar nos tecidos de <i>Danio rerio</i>	31
5.2	Análise Quantitativa	33
5.2.1	Análise por EDXRF com geometria triaxial	33
5.3	Análise por μ -EDXRF	34
5.3.1	Análise por tecidos alvos	34
5.3.2	Análise por Sexos	37
5.4	Análise por ICP-AES	39
5.4.1	Estudo bioacumulação de Hg	39
5.4.2	Análise da água	40
5.5	Análise de biomarcadores	41
5.5.1	Enzimas Antioxidantes	41
5.5.2	Peroxidação Lipídica	43
5.5.3	Vitelogenina (VTG)	44
6	Conclusões e Trabalho Futuro	47
	Referências Bibliográficas	49
A	Valores associados às amostras de peixe-zebra	57

B	Valores associados à técnica de EDXRF com geometria triaxial	59
C	Valores associados à técnica de μ-EDXRF	61
D	Valores associados à técnica de ICP-AES	63
E	Valores associados ao estudo enzimático	67
F	Valores associados à análise estatística	69
G	Exposições do trabalho	73

LISTA DE FIGURAS

2.1	Esquema ilustrativo das principais vias de exposição do Hg.	6
2.2	Esquema ilustrativo do desenvolvimento do peixe-zebra às 6 horas, 24 horas e 120 horas após fertilização.	11
2.3	Corte histológico de uma fêmea adulta de <i>Danio rerio</i>	12
2.4	Corte histológico de um macho adulto de <i>Danio rerio</i>	12
3.1	Esquema ilustrativo das transições eletrônicas possíveis no átomo.	16
3.2	Esquema ilustrativo do espectro de emissão de raios-X.	16
3.3	Esquema ilustrativo do rendimento de fluorescência em função do número atômico Z e das camadas eletrônicas K e L.	17
3.4	Esquema ilustrativo do átomo para o efeito fotoelétrico.	18
3.5	Esquema ilustrativo do átomo para a dispersão incoerente ou dispersão de Compton.	19
3.6	Esquema ilustrativo dos capilares óticos de raios-X.	21
3.7	Esquema ilustrativo da posição da fonte excitação, amostra e do detetor no equipamento de μ -EDXRF.	21
3.8	Esquema ilustrativo da montagem EDXRF com geometria triaxial.	22
3.9	Sobreposição do espectro característico de EDXRF com geometria triaxial com μ -EDXRF obtido no presente estudo.	23
4.1	Tanques de bioensaio de exposição ao Hg (A) e o modelo biológico <i>Danio rerio</i> (B).	26
4.2	Montagem da amostra em estudo para análise por μ -EDXRF e EDXRF com geometria triaxial.	26
5.1	Mapeamento elementar do peixe-zebra relativamente ao grupo de controlo (não exposto a Hg).	32
5.2	Mapeamento elementar do peixe-zebra relativamente ao grupo contaminado com concentração nominal de 100 $\mu\text{g/L}$ de HgCl_2	32
5.3	Mapeamento elementar do peixe-zebra relativamente ao grupo contaminado com concentração nominal de 200 $\mu\text{g/L}$ de HgCl_2	32
5.4	Mapeamento elementar do peixe-zebra relativamente ao grupo contaminado com concentração nominal de 400 $\mu\text{g/L}$ de HgCl_2	33

5.5	Comparação da concentração elementar média obtida nas amostras estudadas dos diferentes grupos de contaminação.	34
5.6	Comparação da concentração elementar média obtida de Hg nas amostras estudadas dos diferentes grupos de contaminação.	34
5.7	Comparação da concentração elementar média de Hg obtida para os três grupos em estudo, em função dos tecidos alvos.	36
5.8	Distribuição das amostras em estudo em função da afinidade aos tecidos alvos (brânquias, cérebro, área visceral). Note-se que cada ponto corresponde a um único peixe.	37
5.9	Comparação da concentração elementar média de Hg obtida para os três grupos em estudo, em função do sexo dos animais e da área visceral.	38
5.10	Comparação da concentração elementar média de Hg obtida para os três grupos em estudo, em função do sexo dos animais e das brânquias.	38
5.11	Comparação da concentração elementar média de Hg obtida para os três grupos em estudo, em função do sexo do animal e do cérebro.	39
5.12	Comparação da concentração elementar média de Hg em função da concentração nominal de Hg na água na técnica de EDXRF com geometria triaxial e na técnica de ICP-AES.	40
5.13	Comparação dos diferentes níveis da atividade da GST comparativamente ao grupo de controlo e os expostos ao Hg para <i>Danio rerio</i>	42
5.14	Comparação dos diferentes níveis da atividade da CAT comparativamente ao grupo de controlo e os expostos ao Hg para <i>Danio rerio</i>	43
5.15	Comparação dos diferentes níveis de concentração de MDA comparativamente ao grupo de controlo e os expostos ao Hg para <i>Danio rerio</i>	44
5.16	Influência do Hg como desregulador endócrino para <i>Danio rerio</i>	45
D.1	Reta utilizada para efeitos de calibração para o Hg de baixas concentrações.	64
D.2	Reta utilizada para efeitos de calibração para o Hg de altas concentrações.	65
G.1	Poster científico apresentado na conferência Heavy Metals 2016.	73
G.2	Poster científico apresentado no 1st Biomedical Engineering Workshop 2016.	74
G.3	Poster científico apresentado na conferência EXRS 2016.	75

LISTA DE TABELAS

5.1	Comparação da concentração de Hg na água às 0 horas e após 24 horas. . . .	41
5.2	Percentagem de fêmeas e machos nos diferentes grupos estudados.	44
A.1	Dados <i>D. rerio</i> do grupo de controlo.	57
A.2	Dados <i>D. rerio</i> do grupo exposto à concentração nominal 100 µg/L.	57
A.3	Dados <i>D. rerio</i> do grupo exposto à concentração nominal 200 µg/L.	58
A.4	Dados <i>D. rerio</i> do grupo exposto à concentração nominal 400 µg/L.	58
A.5	Taxa de mortalidade para o grupo de controlo e para cada concentração testada.	58
B.1	Dados associados à concentração elementar média obtida para os vários elementos presentes nas amostras de 100 µg/L e 200 µg/L.	59
B.2	Dados associados à concentração elementar média obtida para os vários elementos presentes nas amostras de 400 µg/L e controlo.	60
C.1	Dados associados à concentração elementar média de Hg obtida em função dos tecidos alvos (área visceral, brânquias e cérebro).	61
C.2	Dados associados à concentração elementar média de Hg obtida em função dos tecidos alvos (área visceral, brânquias e cérebro) e do sexo.	61
D.1	Dados associados à concentração elementar média de Hg obtida para os diferentes grupos estudados (100 µg/L, 200 µg/L, 400 µg/L e controlo).	63
D.2	Dados associados à reta de calibração de Hg para baixas concentrações. . . .	64
D.3	Dados associados à reta de calibração de Hg para altas concentrações. . . .	65
E.1	Dados dos diferentes níveis da atividade da CAT para os diferentes grupos estudados (100 µg/L, 200 µg/L, 400 µg/L e controlo).	67
E.2	Dados dos diferentes níveis da atividade da GST para os diferentes grupos estudados (100 µg/L, 200 µg/L, 400 µg/L e controlo).	67
E.3	Dados dos diferentes níveis de peroxidação lipídica para os diferentes grupos estudados (100 µg/L, 200 µg/L, 400 µg/L e controlo).	68
E.4	Dados da influência do Hg como desregulador endócrino para os diferentes grupos estudados (100 µg/L, 200 µg/L, 400 µg/L e controlo).	68
F.1	Dados associados à análise estatística realizada para a GST.	69

F.2	Dados associados à análise estatística realizada para CAT.	69
F.3	Dados associados à análise estatística realizada para peroxidação lipídica. . .	70
F.4	Dados associados à análise estatística realizada para a VTG.	70
F.5	Dados associados à análise estatística realizada para a VTG-Fêmeas.	70
F.6	Dados associados à análise estatística realizada para a VTG-Machos.	71
F.7	Dados associados à análise estatística realizada para ICP-AES.	71
F.8	Dados associados à análise estatística realizada para μ -EDXRF em relação à área visceral.	71
F.9	Dados associados à análise estatística realizada para μ -EDXRF em relação às brânquias.	72
F.10	Dados associados à análise estatística realizada para μ -EDXRF em relação ao cérebro.	72

LISTA DE ACRÓNIMOS E SIGLAS

μ -EDXRF *Micro energy-dispersive X-ray fluorescence* (micro-fluorescência de raios-X por dispersão em energia).

ADN Ácido desoxiribonucleico.

CAT Catalase.

EDXRF *Energy-dispersive X-ray fluorescence* (fluorescência de raios-X por dispersão em energia).

EPA *Environmental Protection Agency*.

FCT-UNL Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

GST Glutathione-S-Transferase.

ICP-AES Espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido.

LD Limite de deteção.

MDA Malondialdeído.

OMS Organização Mundial de Saúde.

ROS *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigénio).

SDD *Silicon Drift Detector*.

SNC Sistema nervoso central.

TBA Ácido tiobarbitúrico.

VTG Vitelogenina.

XRF *X-ray fluorescence* (fluorescência de raios-X).

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Coeficiente linear de absorção
\overline{X}_p	Média ponderada
ρ	Densidade
σ	Desvio padrão
C_i	Concentração do elemento i
d	Espessura
Z	Número atómico
A_i	Fator de atenuação
Al	Alumínio
As	Arsénio
Be	Berílio
Br	Bromo
Ca	Cálcio
Cd	Cádmio
Co	Cobalto
Cr	Mercúrio
Cu	Cobre
Fe	Ferro
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
Hg	Mercúrio
Hg ⁺	Ião mercurioso

Hg^{2+} Ião mercúrico

HgCl_2 Cloreto de mercúrio

Hg^0 Mercúrio metálico

HNO_3 Ácido nítrico

I_0 Intensidade inicial do feixe

I_i Intensidade da radiação X característica do elemento i

K Camada eletrónica com o número quântico principal (1)

K Potássio

$K\alpha$ Riscas mais intensas da série K do espectro descontínuo de raios-X

$K\beta$ Segundas riscas mais intensas da série K do espectro descontínuo de raios-X

K_i Fator calibração experimental

L Camada eletrónica com o número quântico principal (2)

m Massa

MeHg Metilmercúrio

Mn Manganês

Mo Molibdénio

N Número medições efetuadas

N_b Número de contagens do fundo

N_p Número de contagens em relação ao pico do elemento

Ni Níquel

O_2 Oxigénio

P Fósforo

Pb Chumbo

Pt Platina

Rh Ródio

S Enxofre

Sb Antimónio

Ti	Titânio
x_i	Incerteza experimental
Zn	Zinco

INTRODUÇÃO

Os metais diferem das outras substâncias tóxicas, pois não são nem criados nem destruídos pelo Homem [1]. Dentro deste grupo de elementos existe um subgrupo de grande importância, os metais pesados, tendo como exemplos, o Arsénio (As), Mercúrio (Hg) e o Cádmio (Cd), que apresentam uma densidade relativamente elevada e são altamente tóxicos a uma concentração reduzida. A toxicidade pode-se definir como um conjunto de efeitos adversos ou nocivos produzidos por uma substância quando interage com um organismo vivo [2].

A poluição tornou-se uma séria ameaça, sendo esta prejudicial não só à saúde pública, mas também ao ambiente. Os metais pesados libertados para o ambiente através da atmosfera pela erosão do solo, pelos resíduos domésticos/ industriais e outras atividades humanas podem contaminar os ecossistemas, e em particular os ecossistemas aquáticos, podendo afetar o equilíbrio ecológico e a diversidade das espécies aquáticas. Tendo em conta que estes elementos são os principais poluentes para os organismos aquáticos, a principal fonte de exposição de Hg e As para o Homem ocorre através do consumo de peixe contaminado. Estes elementos são tóxicos uma vez que se bioacumulam nos organismos vivos, isto é, ocorre o aumento da concentração de uma substância tóxica no organismo ao longo do tempo em comparação com a concentração da mesma no ambiente [2]. Assim, a poluição por metais pesados é um dos maiores problemas para a saúde do Homem, em particular aqueles cuja dieta principal é à base de produtos de pesca. Por exemplo, peixes como a cavala, tubarão e espadarte apresentam elevados níveis de Hg, em contraste com o atum processado, camarão, salmão e vieiras que apresentam concentrações reduzidas de Hg [3]. No entanto, estes metais também podem ser prejudiciais para a saúde humana através de outras vias de absorção, como a ingestão oral direta, a inalação e a absorção dérmica [4].

Segundo a Agência de Proteção Ambiental (conhecida pelo acrónimo EPA de "Environmental Protection Agency") dos EUA, o As, Cd, Pb e Hg são considerados os metais

pesados mais tóxicos para o Homem e para o ambiente [2] e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Hg é atualmente uma das dez maiores preocupações para a saúde pública [5]. A intoxicação por parte deste elemento pode causar danos severos na saúde humana provocando diversas patologias como a cegueira, disartria, défices neurológicos, defeitos no desenvolvimento e em certos casos pode resultar em morte.

No presente estudo procedeu-se à exposição de peixes-zebra (*Danio rerio*) através da água com Hg. Os ensaios de exposição decorreram no Biotério do Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL) com a finalidade de analisar a distribuição elementar do Hg e outros elementos traço, de modo a analisar a distribuição nos tecidos alvos e proceder à sua quantificação após a exposição. Para tal, foram utilizadas duas técnicas de análise elementar: a técnica de Fluorescência de raios-X (XRF) e a técnica de Espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido (ICP-AES), tendo a última técnica o intuito de confirmar e/ou complementar os resultados da primeira. Estas técnicas permitem a determinação da quantificação elementar e composição dos elementos presentes na amostra.

Neste contexto é possível encontrar na literatura vários estudos que mostram que a técnica de XRF apresenta múltiplas vantagens sobre outros métodos analíticos e, possibilita assim, a análise elementar em amostras biológicas [6].

Aldroobi *et al.* [7] recorreram à técnica de XRF para determinar a concentração de As e Hg no cabelo humano de 100 residentes de Penang, Malásia. O cabelo geralmente contém elevadas concentrações de metais em relação a outras amostras, como a urina ou sangue. A concentração destes elementos tóxicos depende da exposição ambiental a que estão sujeitos. Os resultados obtidos foram comparados com resultados semelhantes de outros países e, concluíram que a concentração de ambos os elementos não diferem de outros valores reportados de outras regiões do mundo.

O estudo de Carvalho *et al.* [8] consistiu na quantificação de certos elementos em tecidos cancerígenos e saudáveis. Elementos como o Be, Cr, Co, Ni, As, Cd, Sb, Pb, Hg e Pt são considerados cancerígenos. Estudos comparativos entre diferentes técnicas de fluorescência de raios-X em diferentes tecidos humanos revelaram a mesma tendência em acumular elementos como o P, S, K, Ca, Fe e Cu em tecidos cancerígenos e uma diminuição na acumulação de Zn e Br. Estes estudos concluíram que dependendo do tipo tecido (i.e., cólon, mama e útero) ocorrem diferentes concentrações elementares em tecidos malignos comparados com os saudáveis.

Madakovic *et al.* [9] determinaram a concentração de metais pesados em maxilares e dentes de um conjunto de peixes adultos (*Sparus aurata* e *Diplodus sargus*) através da técnica de XRF, ICP-AES para fins de biomonitorização e estudos ecológicos.

A biocumulação de metais pesados nos tecidos moles de organismos marinhos pode refletir indiretamente a distribuição como a quantidade dos poluentes presentes no ecossistema e, deste modo, estes tecidos devem ser utilizados para monitorização de poluentes ambientais. Os resultados obtidos neste estudo confirmam que, além da análise por ICP-AES, a análise por XRF permite concluir informações adicionais relativamente a

concentração de elementos tóxicos presentes no ambiente.

Paralelamente analisaram-se algumas respostas bioquímicas causadas pela exposição ao Hg através da determinação de enzimas antioxidantes (catalase, glutational-s-transferase) e da peroxidação lipídica. Por outro lado estudou-se o efeito do Hg como potencial desregulador endócrino, através da determinação dos níveis da proteína vitelogenina. Para além disso, a determinação desta proteína permitiu diferenciar o sexo dos animais.

Deste modo, o estudo realizado é extremamente importante na caracterização da bioacumulação deste elemento em seres vivos e é possível a extrapolação dos resultados para outras espécies vertebrados superiores, contribuindo para um maior conhecimento e possíveis inovações a nível biomédico [10].

MERCÚRIO E TOXICIDADE

2.1 Mercúrio (Hg)

O Hg é o único metal líquido à temperatura ambiente que ocorre, não só antropogenicamente, mas também naturalmente no ambiente, em diferentes formas químicas e físicas, todas as quais produzem efeitos tóxicos em doses elevadas em vários órgãos como o cérebro, rins, pulmões, sobre o sistema digestivo, nervoso e imunitário [11]. Este é considerado um dos principais poluentes ambientais e tem sido utilizado abundantemente na medicina, agricultura e indústria [12].

2.1.1 Principais formas de mercúrio

No ambiente existem três formas principais de Hg: Hg elementar, compostos inorgânicos de Hg e compostos orgânicos de Hg [13]. Encontram-se em um dos três estados de oxidação, cada um com um grau de toxicidade específico. No estado de oxidação nula (Hg^0), o Hg elementar existe sob a forma metálica líquida ou como vapor, apresentando baixa viscosidade e alta densidade, alta condutância elétrica, sendo assim muito utilizado em equipamentos elétricos e dispositivos científicos [12].

As duas principais formas de Hg inorgânico são o ião mercuroso (Hg^+) ou o ião mercúrico (Hg^{2+}), também designadas como sais de Hg inorgânico [11, 14, 15]. Os sais de Hg são mais solúveis em água e apresentam maior toxicidade que o Hg elementar. O ião mercúrico pode formar compostos orgânicos, tais como metilmercúrio, etilmercúrio, fenilmercúrio ou dimetilmercúrio, pela ação de microrganismos do solo e da água [11, 15, 16]. O Hg orgânico é a forma mais tóxica de Hg para a saúde humana e o metilmercúrio (MeHg) apresenta um elevado risco através do peixe consumido [3]. Entre os compostos de Hg orgânico, o dimetilmercúrio é o mais tóxico, podendo causar morte com apenas uma gota sobre a pele, ou mesmo, sobre luvas de látex [17].

As diferentes formas de Hg determinam os meios de exposição, os mecanismos de absorção, de distribuição, de bioacumulação e os respectivos tecidos alvo e consequentemente os efeitos na saúde [12].

2.1.2 Principais vias de exposição

A libertação de Hg processado pode gerar um aumento da quantidade de Hg atmosférico, que ao entrar nos ciclos de distribuição de água do solo pode permanecer em circulação durante anos. Devido à contaminação dos solos, passa a existir a possibilidade do Hg entrar na cadeia alimentar e, uma vez na cadeia alimentar, ocorre bioacumulação causando diversos efeitos na saúde humana [17]. A figura 2.1 apresenta as possíveis vias de exposição através das quais os seres humanos estão expostos ao Hg.

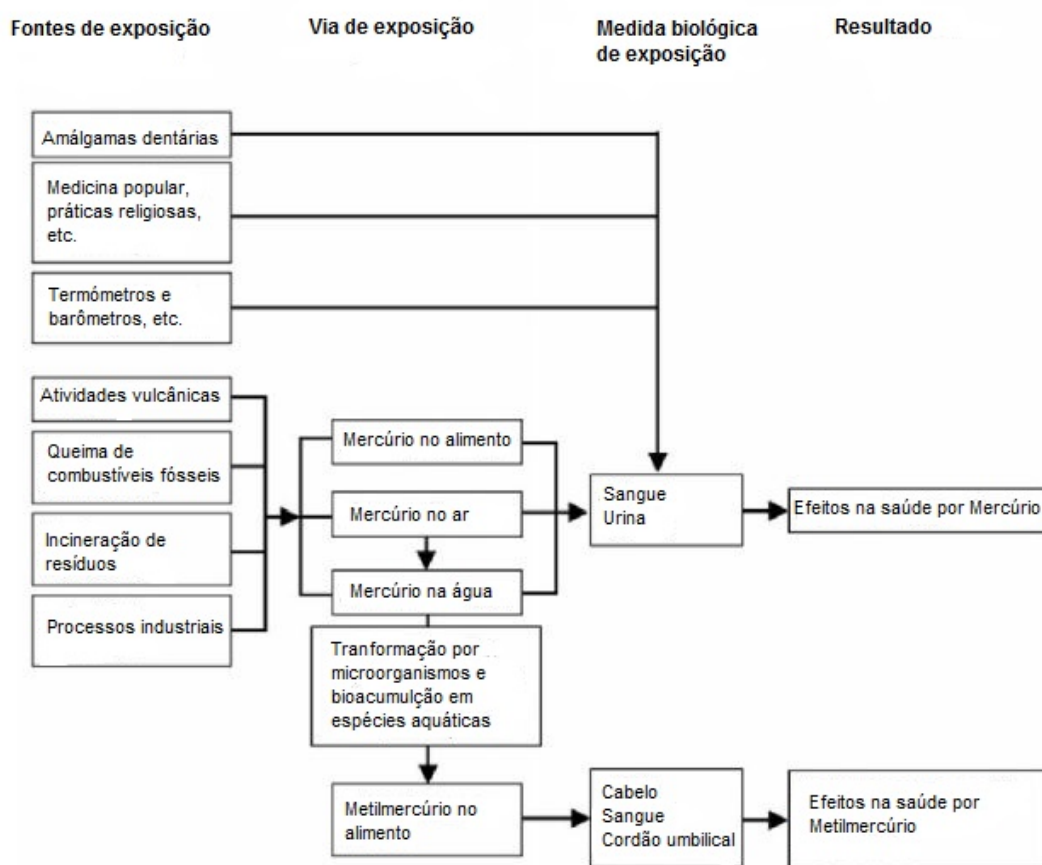


Figura 2.1: Esquema ilustrativo das principais vias de exposição do Hg (adaptado de [3]).

A exposição ao Hg elementar no seu estado gasoso pode ser proveniente de diversas fontes nomeadamente de atividades vulcânicas, atividades de mineração, incineração de resíduos industriais e médicos, erosão natural da crosta terrestre, vaporização a partir de amálgamas dentárias, enquanto que a exposição no estado líquido deve-se a vários

dispositivos científicos, como termômetros, barômetros, produtos farmacêuticos, baterias, amálgamas dentárias e espelhos [12, 15, 17]. Outra fração significativa da absorção do Hg dá-se pela utilização de compostos de Hg inorgânico na indústria cosmética, em antissépticos, anti bacterianos e pigmentos de tintas [15].

Quanto ao Hg orgânico, a sua forma mais comum é MeHg sendo esta a maior fonte de Hg orgânico presente nos ecossistemas. É transportado através da água devido à sua fraca solubilidade e facilmente absorvido por microrganismos, invertebrados e outros animais da cadeia alimentar. Para além de se bioacumular nos organismos vivos, o Hg vai sofrer bioamplificação ao longo da cadeia alimentar observando-se em concentrações mais elevadas no topo da cadeia alimentar. Deste modo, a principal via de exposição para o Homem destes compostos ocorre por ingestão de alimentos contaminados com MeHg [11, 15, 17].

2.1.3 Interações no organismo

O Hg elementar é fracamente absorvido por ingestão e absorção dérmica e, deste modo a sua principal via de absorção é por inalação de vapor de Hg. Neste processo, 80% do Hg^0 é retido e rapidamente absorvido através das membranas dos alvéolos pulmonares, difundido na corrente sanguínea (tendo em conta que é um gás monoatômico, sem carga e lipossolúvel) e distribuído para todos os órgãos do corpo humano [11]. O Hg elementar presente na corrente sanguínea pode ser oxidado nos glóbulos vermelhos originando Hg inorgânico (Hg^{++}). Esta oxidação ocorre pelo peróxido de hidrogénio e devido à enzima catalase [15]. Embora o Hg oxidado não apresente a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, o vapor de Hg^0 permanece tempo suficiente na corrente sanguínea para uma quantidade significativa atravessar a barreira hematoencefálica e depositar-se no cérebro antes de ser oxidado [12]. Após depositar-se no cérebro, este pode ser oxidado acumulando-se neste órgão durante longos períodos de tempo (cerca de 20 anos). Por outro lado, a exposição por ingestão é baixa, inferior a 0.01% da dose ingerida, sendo assim pouco absorvida no trato gastrointestinal [11, 16]. O Hg^0 inalado por uma mulher grávida tem a capacidade de atravessar facilmente a placenta embrionária, resultando então num elevado risco de exposição para o feto [16]. Deste modo, a inalação de vapor de Hg é muito mais perigosa comparativamente com a ingestão de Hg líquido. Este tem como principais tecidos alvos o córtex renal, fígado e especialmente o cérebro ocorrendo biocumulação nestes tecidos [17].

Os sais de Hg, como o cloreto de mercúrio (HgCl_2) apresentam uma toxicidade superior ao Hg elementar e são absorvidos principalmente pelo trato gastrointestinal [11, 17]. Em comparação com o Hg elementar, estes não conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e a placenta devido à sua fraca lipossolubilidade, provocando um dano neurológico menor [15]. Após a ingestão destes compostos, apenas 10% a 15% é absorvido pelo trato gastrointestinal nos adultos, podendo a absorção ser mais elevada em crianças [15].

O rim é o principal órgão de bioacumulação de sais de Hg inorgânico provocando danos sobre o mesmo [16].

Relativamente ao Hg orgânico e, como já foi referido anteriormente, a principal via de exposição é o consumo de alimentos contaminados com MeHg, consequentemente, a principal via de absorção desta forma de Hg é por ingestão. De todo o Hg absorvido no corpo cerca de 95% é absorvido no trato gastrointestinal. De seguida é transportado para os rins onde ocorre a distribuição de MeHg para todos os tecidos do corpo humano [15]. Após ingestão de doses elevadas, apresenta toxicidade para o cérebro, rins e sistema imunológico. Este composto é neurotóxico e consegue atravessar tanto a barreira hemato-encefálica como a placenta, sendo extremamente tóxico para a pessoa exposta [13].

A semi-vida biológica das diferentes formas de Hg depende da espécie, sexo, dose e idade (as crianças apresentam maior taxa de absorção). Ainda assim, foi estimado que o MeHg demora cerca de 70 a 80 dias a ser eliminado, o Hg elementar cerca de 60 dias e compostos inorgânicos de Hg entre 1 a 2 meses [18].

A excreção de Hg ocorre principalmente através de excreção urinária e fecal e através da respiração, suor e saliva, ainda que em quantidade menor [16]. Contudo, depende das diferentes formas de Hg, dose e duração da exposição [11].

2.1.4 Toxicidade

A intoxicação por Hg irá depender da duração da exposição, isto é, se for uma exposição aguda ou crónica. Uma exposição aguda tem duração inferior a 24 horas por uma única ou múltiplas exposições. Relativamente à exposição crónica, é uma exposição de doses repetidas num período de tempo prolongado (superior a 3 meses).

Uma exposição aguda em doses elevadas de sais de Hg inorgânico pode provocar dor no peito, coloração acinzentada da mucosa oral associada a um gosto metálico, disfunção renal e pode causar vômitos, diarreia, náuseas e dor abdominal como resultado da ulceração gastrointestinal, ou possível perfuração [17]. Por serem corrosivos, estes são irritantes, causando dermatite, descoloração das unhas, corrosão das membranas mucosas e queimaduras.

Altas doses de vapor de Hg associadas a uma exposição aguda causam graves danos nos pulmões, nomeadamente, hipóxia, podendo levar mesmo à morte. Também provocam toxicidade no sistema nervoso central (SNC), com sintomas tais como, tremores, perda de memória, parestesias, reflexos retardados e visão turva, sendo estes sintomas geralmente reversíveis [12, 18].

Por outro lado, uma exposição crónica a sais Hg inorgânico origina toxicidade a nível dos rins, provocando poliúria e, assim, proteinúria que pode evoluir para síndrome nefrótica em casos graves [12].

Após uma exposição crónica ao vapor de Hg resulta principalmente em efeitos neurológicos a nível do SNC. Os sintomas podem incluir insónia, estomatite, alucinações, dor de cabeça, entre outros [15]. Também pode afetar o sistema renal (proteinúria ou síndrome

nefrótica), sistema imunitário, que pode resultar numa diminuição da resistência a infeções, cancros e desenvolvimento de auto imunidade [12]. Em crianças, a exposição crónica ao vapor de Hg e a sais Hg inorgânico pode provocar acrodinia (conhecida como "pink disease").

O desastre ambiental perto da baía de Minamata no Japão (1953-1956) é um dos maiores exemplos da exposição crónica ao Hg orgânico devido a ingestão de peixe contaminado por MeHg. Os danos neurológicos tornaram-se extremamente evidentes, especialmente no caso de exposição durante a gravidez. Ocorreram diversas patologias, como deficiência mental, cegueira, paralisia cerebral, surdez, convulsões, disartria e deformações nos membros. Nos dias de hoje, a maior preocupação na exposição crónica de doses baixas de MeHg são os possíveis efeitos neurotóxicos [15].

O mecanismo principal de toxicidade de Hg está relacionado com a sua grande afinidade para grupos tiol (-SH) ou sulfidrílo o que leva a alterações na permeabilidade da membrana, na estrutura macromolecular e danos no ADN. Além disso, o Hg provoca stress oxidativo e disfunção mitocondrial [17].

Alguns compostos presentes na urina fazem desta o biomarcador mais adequado para exposições prolongadas de Hg elementar e inorgânico. A semi-vida biológica do Hg no sangue é de 3 dias, pelo que, recomenda-se que a análise ao sangue seja realizada logo após a exposição [16]. Deste modo, o sangue é muito utilizado em casos de exposição de curto prazo. Tendo em conta que a maioria dos métodos analíticos não consegue distinguir Hg orgânico de inorgânico, a concentração de Hg encontrada no sangue é, deste modo, a concentração total [16].

Em suma, e tendo em conta o número de órgãos e funções celulares que são afetados pela exposição das diferentes formas de Hg, pode dizer-se que este é extremamente prejudicial para a saúde pública.

2.2 Peixe-zebra (*Danio rerio*)

2.2.1 Modelo biológico

Para um organismo ser considerado como modelo biológico deverá apresentar vantagens técnicas, de modo a facilitar o estudo dos efeitos, processos e mecanismos biológicos envolvidos num contexto de ensaio experimental. Além disso, deverá possuir características possíveis de serem generalizadas e, assim, representar um grupo maior de organismos. Ambos os argumentos são válidos e aplicam-se aos peixes-zebra, sendo uma espécie validada e padronizada para a realização de ensaios biológicos, de baixo custo e de fácil manutenção em condições laboratoriais [19].

Os peixes-zebra exibem características fisiológicas semelhantes a outros vertebrados, possuindo cerca de três centímetros de comprimento no estado adulto e no estado larvar atingem entre um a quatro milímetros, facilitando o manuseamento dos mesmos [20]. De entre todas as vantagens técnicas desta espécie como organismo modelo, é de salientar a

sua fácil manutenção, a curta duração dos ensaios, a alta fecundidade (alguns reprodutores podem gerar aproximadamente 100 a 300 embriões por semana), a facilidade de observação e manipulação, morfologia precoce e a informação genética disponível, uma vez que esta espécie apresenta o genoma totalmente sequenciado, apresentando uma homologia significativa com o genoma humano (cerca de 75%) e disponível em bases de dados de acesso gratuito (ex: ZFIN, The Zebrafish Server). Um grande número destes peixes pode ser alojado e mantido em instalações relativamente pequenas, possibilitando a redução dos custos de manutenção e cultura [10, 19, 20].

O peixe-zebra, enquanto modelo biológico, permite a realização de ensaios de toxicidade seguindo normas pré-estabelecidas e padronizadas e que possibilitam a extrapolação dos resultados para outras espécies de vertebrados superiores, incluindo o Homem [21, 22, 23].

Os ensaios de toxicidade são realizados através da exposição dos animais a agentes químicos ou outros contaminantes. Geralmente a exposição a estes agentes pode ser feita através da água, via alimentação ou por injeção intra-muscular ou intraperitoneal. Na exposição via água, o(s) agente(s) a testar são adicionados à água onde se encontram os animais, numa concentração previamente determinada. De um modo geral, as principais vias de entrada são as brânquias e o trato gastrointestinal. Ao comparar com testes toxicológicos em outros organismos biológicos, os estudos demonstram que podem ser utilizados em cada ensaio números estatisticamente significantes de peixes-zebra e são necessárias quantidades reduzidas de tóxico [21]. No entanto, além de serem utilizados como um organismo modelo para testes de toxicidade em vertebrados, também são utilizados como uma espécie para ensaios ecotoxicológicos sendo possível determinar os efeitos dos produtos químicos em peixes sobreviventes, o crescimento, reprodução e, assim, originar critérios de qualidade da água [19].

O peixe-zebra continua a ser um organismo modelo relativamente pouco usado mas apresenta um grande potencial ainda por explorar [10]. Com o avanço da investigação dos efeitos toxicológicos ao nível genético nesta espécie e a comparação com as bases de dados genómicos existentes, permitirá a extrapolação dos resultados para outras espécies vertebrados superiores, incluindo o Homem.

2.2.2 Anatomia

De um modo geral pode dizer-se que o peixe-zebra e os mamíferos apresentam grandes semelhanças a nível anatomofisiológico e molecular [10]. O desenvolvimento de órgãos como o coração, cérebro, fígado, pâncreas, rim, intestino, ossos, músculos, sistema nervoso e órgãos sensoriais, inicia-se 120 h após a fertilização, como se pode observar na figura 2.2 [21].

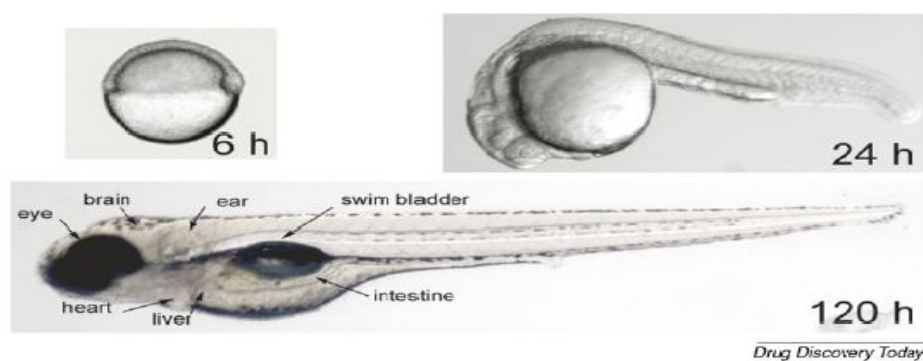


Figura 2.2: Esquema ilustrativo do desenvolvimento do peixe-zebra às 6 horas, 24 horas e 120 horas após fertilização (adaptado de [21]).

O coração é o primeiro órgão a desenvolver-se, e o sistema cardiovascular é totalmente funcional apresentando complexos canais de íons e processos metabólicos. Apesar de os peixes-zebra e os mamíferos diferirem na estrutura do coração, possuem características funcionais muito semelhantes. Isto é, o sangue flui do ventrículo para a veia aorta onde ocorre distribuição para todo o corpo, existem válvulas que só permitem o sangue fluir num único sentido e o ritmo cardíaco é regulado por um sistema elétrico [21].

Os embriões dos peixes-zebra são relativamente transparentes na fase embrionária bem como no início da fase adulta; uma característica que facilita a observação direta de órgãos internos por microscopia ótica. Durante a organogênese, os embriões são permeáveis a pequenas moléculas e a tóxicos, proporcionando uma via fácil para a administração do tóxico [10].

Tendo em conta ser possível realizar testes *in vitro* com células de culturas, de modo a avaliar os potenciais efeitos tóxicos de uma substância, estes não são ideais, uma vez que os resultados não têm em conta processos metabólicos, de absorção, distribuição ou excreção [21].

Contudo, os peixes-zebra como modelo biológico apresentam certas desvantagens. Especificamente, a falta de certos órgãos de mamíferos como os pulmões, a próstata, a pele e glândulas mamárias, refletindo a sua distância relativa na árvore evolutiva de humanos. No entanto, esta lacuna é contrabalançada por várias vantagens já referidas. Além disso, a sequenciação do genoma do peixe-zebra facilitou a abordagem genética para modelar a fisiopatologia humana [10].

Nas figuras 2.3 e 2.4 mostram-se cortes histológicos representativos da anatomia de *Danio rerio* (fêmea e macho) adultos.

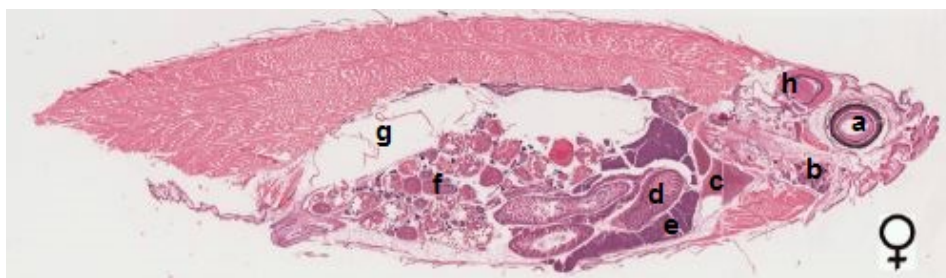


Figura 2.3: Corte histológico de uma fêmea adulta de *Danio rerio* (adaptado de [24]).
Legenda: a-olho, b-brânquias, c-coração, d-intestino, e-fígado, f-gónadas (ovários), g-bexiga natatória.



Figura 2.4: Corte histológico de um macho adulto de *Danio rerio* (adaptado de [24]).
Legenda: a-brânquias, b-coração, c-intestino, d-gónadas (testículos), e-bexiga natatória, f-cérebro.

2.2.3 Acumulação de Hg nos tecidos alvos

Metais pesados, como o Hg, apresentam diferentes afinidades para os vários órgãos dos peixes e, assim, diferentes tecidos alvo. A sua concentração no tecido alvo, não está diretamente relacionada com a exposição a esses metais, mas sim aos processos metabólicos e funções dos vários órgãos. As brânquias estão em contacto direto com a água envolvente e com os materiais suspensos e, deste modo, são o primeiro órgão a ser exposto apresentando níveis significativos de interação com os iões metálicos. Estas possuem diversas funções fisiológicas como osmorregulação e trocas gasosas. Devido a estas funções, as brânquias são de extrema importância na troca entre os metais presentes no ambiente e os organismos expostos. No fígado também se encontram elevadas concentrações de Hg, pois este tem a capacidade de armazenar o metal das águas envolventes, sendo portanto o indicador ambiental de poluição externa mais comum. Em comparação com as brânquias, fígado e rins, os músculos apresentam concentrações reduzidas dos metais, indicando assim que estes não são tecidos alvo para bioacumulação [25, 26].

2.3 Biomarcadores

Biomarcadores ou marcadores biológicos são substâncias que funcionam como medidas de alterações induzidas por exposições a xenobióticos. Existem três tipos de biomarcadores: os de exposição, de suscetibilidade e de efeito. Neste estudo utilizaram-se

biomarcadores de efeito, nomeadamente de stress oxidativo [27].

O stress oxidativo é a resposta biológica dos organismos marinhos quando expostos a variados fatores ambientais como a temperatura ou contaminações provenientes da indústria, nomeadamente os metais pesados [28]. Este resulta da produção excessiva de espécies reativas de oxigénio (ROS) em relação à formação de agentes de defesa antioxidantes, sendo estes insuficientes para combater os efeitos prejudiciais dos ROS. De modo a lidar com o stress oxidativo, os organismos marinhos produzem enzimas antioxidantes que neutralizam os ROS, como por exemplo, a catalase, glutathione-S-transferase e peroxidase, sendo estas uma importante defesa biológica contra o stress oxidativo. Contudo, quando a produção destas enzimas não é suficiente e o stress é severo, os organismos podem sofrer degradação do ADN, morte celular e peroxidação lipídica [29]. Estudos recentes demonstram que a produção excessiva de ROS (provocando stress oxidativo) é a resposta a um mecanismo de toxicidade importante em organismos expostos a uma variedade de xenobióticos [30].

2.3.1 Enzimas antioxidantes

Neste estudo utilizaram-se vários biomarcadores de stress oxidativo que serão descritos em detalhe de seguida, nomeadamente a glutathione-S-transferase (GST) e a catalase (CAT).

2.3.1.1 Glutathione-S-Transferase (GST)

A GST pertence a um grupo de enzimas com um papel muito importante na biotransformação e eliminação de xenobióticos, apresentando também alguma capacidade de defesa contra o stress oxidativo [31]. Esta enzima protege as células dos agentes tóxicos através da ligação do grupo tiol (-SH) da glutathione (G-SH) a substratos dos xenobióticos e, assim, proteger contra os efeitos tóxicos dos compostos [32].

A atividade da GST está presente na maioria dos tecidos dos mamíferos, particularmente no fígado, que é fundamental no processo de desintoxicação.

2.3.1.2 Catalase (CAT)

A CAT é uma enzima antioxidante presente na maioria das células aeróbicas, envolvida no processo de desintoxicação do peróxido de hidrogénio (H₂O₂), uma ROS. Tal como descrito na equação 2.1 a CAT catalisa a conversão de duas moléculas de H₂O₂ em oxigénio molecular,

isto é,



Os valores mais elevados de CAT encontram-se presentes no fígado, rins e nos eritrócitos.

2.3.2 Peroxidação Lipídica como marcador de stress oxidativo

A peroxidação lipídica define-se como a degradação de lípidos em função de danos oxidativos constituindo um biomarcador muito útil de danos nas membranas celulares causados por stress oxidativo. Ocorre a remoção de eletrões aos lípidos por parte dos ROS, danificando as células, frequentemente nas membranas celulares. O Malondialdeído (MDA) é um composto resultante da peroxidação lipídica e muito sensível ao dano oxidativo nas células [30].

Deste modo, a quantificação de MDA é um bom indicador dos efeitos do stress oxidativo nas células, sendo usualmente determinada através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) [33].

2.3.3 Vitelogenina (VTG)

Foi estudado o efeito do Hg, como potencial desregulador do sistema endócrino. Para tal procedeu-se à determinação da proteína VTG. Esta é uma fosfoproteína sintetizada pelo fígado das fêmeas de ovíparos durante a ovogênese. Após ser produzida no fígado é transportada pela corrente sanguínea até os ovários, onde, é utilizada como precursora de reservas nutricionais para o desenvolvimento de embriões [34, 35]. No entanto, os machos são capazes de sintetizar esta proteína na presença de estrogénio [35]. Para além disso, a avaliação dos níveis desta proteína também permitiu uma identificação inequívoca do sexo dos peixes-zebra em cada ensaio.

PRINCÍPIOS FÍSICOS E TÉCNICAS

3.1 Técnica de Fluorescência de Raios-X (XRF)

Os raios-X são fótons com comprimentos de onda reduzidos, entre 0.005 a 10 nm (aproximadamente gama de energias entre 0.125 a 125 keV) [36], descobertos por Wilhelm Conrad Röntgen em 1895, na Universidade de Würzburg [37].

A partir de um feixe de raios-X e na sequência de um processo de ionização, os elementos presentes na amostra emitem riscas espectrais com energias características de cada elemento e cujas intensidades estão relacionadas com a concentração dos elementos presentes na mesma [8, 38].

Esta técnica consiste na determinação do espectro de raios-X característicos, emitido pelos elementos constituintes da amostra e permite obter informações qualitativas e quantitativas da composição elementar da amostra.

3.2 Produção de raios-X

A produção de raios-X pode ser efetuada por vários mecanismos, nomeadamente, por desaceleração de partículas carregadas, como eletrões, prótons, partículas alfa, ou por transições eletrónicas nas camadas internas dos átomos.

O primeiro mecanismo designado de radiação de travagem ou de *Bremsstrahlung*, é produzido através da desaceleração de partículas carregadas acompanhada com uma perda de energia, devido à brusca mudança de direção das mesmas na vizinhança dos núcleos atômicos. Resultando assim na emissão de um espectro contínuo de radiação [39].

O segundo mecanismo diz respeito a transições eletrónicas, em que ocorre interação entre um fóton incidente e um eletrão ligado. Um eletrão das camadas eletrónicas mais internas pode ser ejetado do átomo, gerando, deste modo, uma lacuna na estrutura eletrónica. Esta lacuna é preenchida por um eletrão das camadas eletrónicas mais externas.

De modo a retornar ao seu estado fundamental emite um fóton de raios-X com energia igual à diferença de energia entre as camadas eletrônicas envolvidas na transição. Se a lacuna for na camada K, estas transições definem-se como $K\alpha, \beta, \dots$, ou seja as transições são designadas dependendo da camada onde se encontra a lacuna e da camada onde resulta o elétron que a irá preencher [40], tal como se observa na figura 3.1.

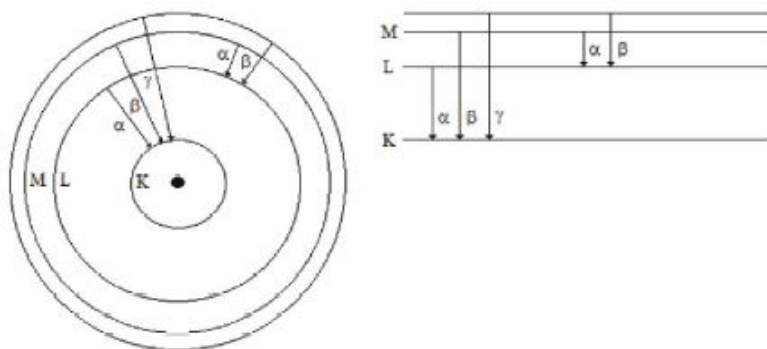


Figura 3.1: Esquema ilustrativo das transições eletrônicas possíveis no átomo (adaptado de [40]).

A radiação emitida é bem definida para cada elemento já que depende da estrutura eletrônica que é característica de cada elemento. Este tipo de radiação, denominada de fluorescência, constitui a componente discreta do espectro de emissão de raio-X. A radiação de fluorescência e a radiação de *Bremsstrahlung* encontram-se representadas na figura 3.2. A fluorescência de raios-X possibilita a determinação da composição dos elementos presentes na amostra, permitindo deste modo uma análise qualitativa e quantitativa.

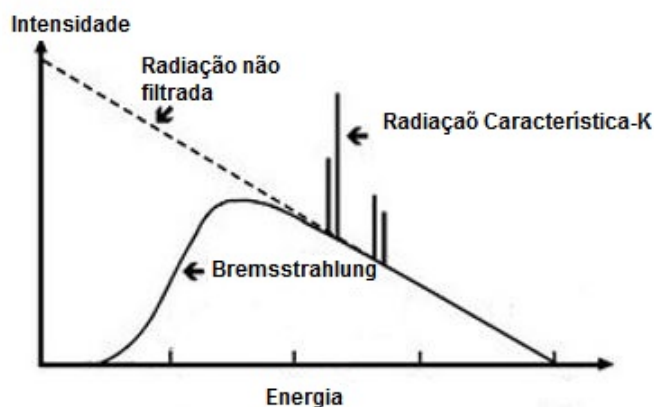


Figura 3.2: Esquema ilustrativo do espectro de emissão de raios-X (adaptado de [41]).

Também pode ocorrer transições eletrônicas em que não ocorre a emissão de um fóton, principalmente no caso de elementos de baixo Z . No entanto, pode ocorrer a ejeção de um elétron do átomo, sendo este designado de elétron de Auger. O rendimento de fluorescência pode-se definir como a razão entre o número de fótons ou elétrons Auger

emitidos numa dada camada (por exemplo na camada K) e o número de átomos ionizados nessa mesma camada [39]. A figura 3.3 mostra o rendimento de fluorescência das camadas eletrónicas (K, L) em função do número atómico Z. É notório o baixo rendimento para elementos leves ou seja, a emissão de eletrões Auger, é favorecida sobre a emissão de fótons para elementos de baixo Z [39].

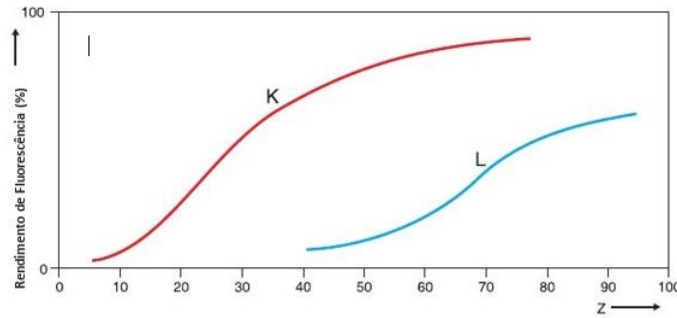


Figura 3.3: Esquema ilustrativo do rendimento de fluorescência em função do número atómico Z e das camadas eletrónicas K e L (adaptado de [36]).

3.3 Interação com a matéria

Existem três principais interações quando um feixe de raios-X entra em contacto com a matéria, nomeadamente, o efeito fotoelétrico, a dispersão de Compton e a dispersão de Rayleigh. Quando um feixe de raios-X incide numa dada superfície, uma fração será transmitida, outra absorvida (produzindo radiação de fluorescência e/ou Auger) e, por último, uma fração será dispersa. Os efeitos de dispersão dependem se a interação é elástica ou inelástica [36].

Tanto o processo de absorção fotoelétrica como os efeitos de dispersão vão contribuir para a atenuação do feixe de raios-X [42]. Esta atenuação é descrita pela Lei de Lambert-Beer [43]:

$$I = I_0 \exp\left[-\frac{\mu\rho}{\rho}d\right] \quad (3.1)$$

onde,

d é a espessura da amostra;

μ é o coeficiente linear de absorção do material da amostra (cm^{-1});

μ/ρ é o coeficiente mássico de absorção do material da amostra (cm^2/g);

I_0 é a intensidade do feixe inicial;

I é a intensidade do feixe depois de atravessar a amostra;

3.3.1 Absorção fotoelétrica

O processo de absorção fotoelétrica é um processo físico no qual um fóton incidente (nesta técnica proveniente de uma fonte de raios-X [40]), interage com um elétron e transmite-lhe toda a sua energia. Desta forma, o elétron designado fotoeletrão, é ejetado do átomo provocando a ionização deste [44]. Para que este processo ocorra, a energia mínima do fóton incidente deve ser superior à energia de ligação do elétron [42], e o fotoeletrão é ejetado com energia igual à diferença entre a energia do fóton incidente e a energia de ligação do elétron [44]. Este processo encontra-se ilustrado na figura 3.4.

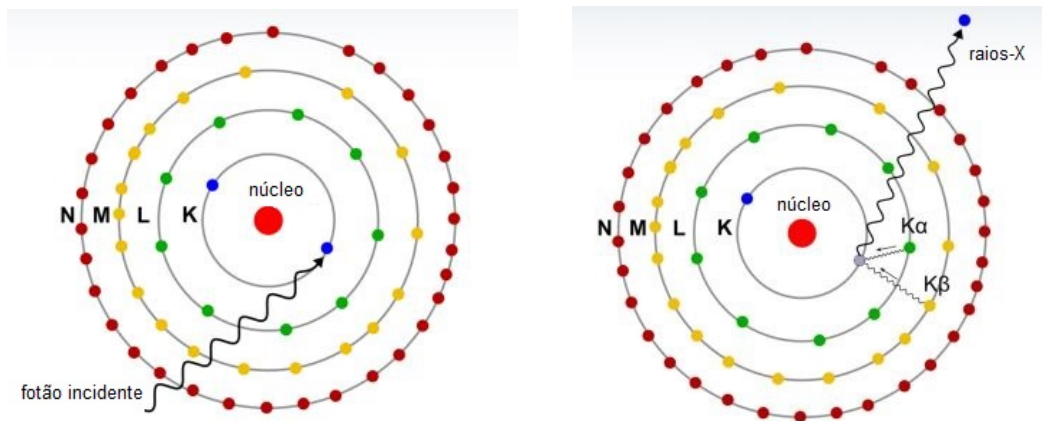


Figura 3.4: Esquema ilustrativo do átomo para o efeito fotoelétrico, onde K, L, M, N diz respeito às camadas eletrônicas (adaptado de [38]).

A probabilidade deste processo ocorrer diminui com o aumento da energia do fóton, sendo nula quando a energia do fóton é menor que a energia do elétron e máxima quando as energias são iguais aumentando em função do número atômico Z [39].

3.3.2 Dispersão Rayleigh

No caso de ocorrer uma interação elástica, isto é, não haver perda de energia no processo de colisão, esta dispersão tem o nome de dispersão coerente ou dispersão de Rayleigh. Como não há troca de energia envolvida, o comprimento de onda da radiação dispersa é exatamente o mesmo que a do feixe incidente, não sendo possível a excitação do átomo [45]. Este efeito resulta da interação entre o fóton incidente e os elétrons fortemente ligados do átomo. Diz-se que a dispersão é coerente, tendo em conta que é um fenómeno cooperativo envolvendo todos os elétrons do átomo [44].

A dispersão de Rayleigh ocorre, principalmente, para fótons de baixas energias ou para alvos com elétrons altamente ligados, que é o caso dos elétrons das camadas internas com elevado número atômico Z [46].

3.3.3 Dispersão Compton

Na dispersão inelástica, o fóton pode ceder parte da sua energia durante a colisão. Esta dispersão é chamada de dispersão incoerente ou dispersão de Compton. Um fóton colide com um elétron "fracamente" ligado (a energia de ligação é muito menor que a energia do fóton incidente) de uma camada eletrônica exterior e, o elétron é ejetado, removendo assim uma pequena fração de energia do fóton incidente, que é então defletido com a correspondente perda de energia, ou aumento do comprimento de onda [45]. A energia do elétron depende da energia do fóton incidente e do fóton defletido, enquanto que a energia do fóton disperso depende não só da energia do fóton incidente, bem como do ângulo que faz a radiação dispersa com a radiação incidente [44]. A dispersão de Compton aumenta com a energia dos fótons incidentes e com a diminuição do número atômico Z [46]. Este efeito encontra-se representado na figura 3.5.

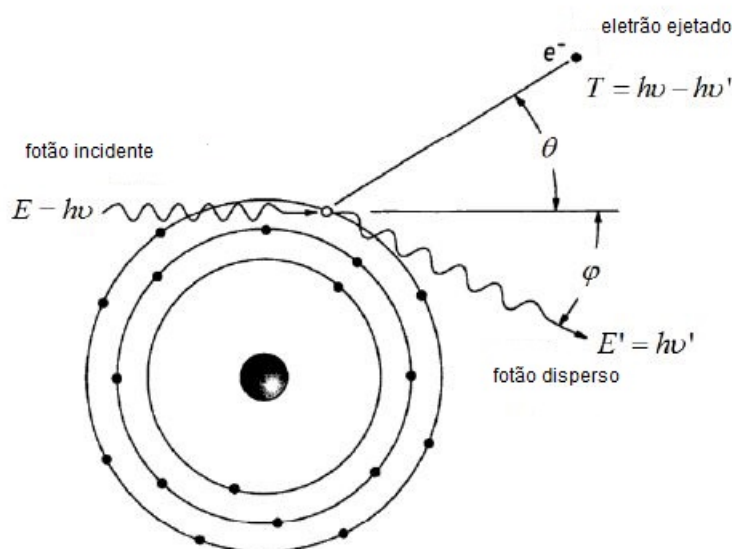


Figura 3.5: Esquema ilustrativo do átomo para a dispersão incoerente ou dispersão de Compton (adaptado de [36]).

Ambos os efeitos de dispersão não contribuem para a identificação dos elementos da amostra em estudo, contudo, são responsáveis pelo aumento da radiação de fundo [46].

3.4 Fluorescência de raios-X por Dispersão em Energia (EDXRF)

O método de fluorescência de raios-X por dispersão em energia (conhecido pelo acrônimo EDXRF do inglês "Energy-dispersive X-ray fluorescence"), possui várias vantagens em relação a outros métodos analíticos [6]. As principais vantagens são a determinação simultânea de vários elementos, a possibilidade de analisar amostras líquidas e sólidas, o

seu carácter não destrutivo, a simplicidade e rapidez na preparação das amostras, possibilidade de uma análise tanto quantitativa como qualitativa, o tempo entre a preparação de amostras e análise de resultados é relativamente pequeno, a determinação de uma vasta gama de concentrações com sensibilidade na gama dos $\mu\text{g/g}$ [38].

Como qualquer outro método analítico, este também possui desvantagens, como a insensibilidade à especiação química, isto é, as diferenças mínimas de energia das orbitais eletrónicas quando um átomo se encontra ligado a uma molécula não são detetáveis, apenas a composição elementar é detetada e não o seu estado molecular. Outra desvantagem é o facto de elementos leves com $Z < 13$ não poderem ser detetados por EDXRF. Isto acontece porque os raios-X de baixa energia são altamente absorvidos no ar e juntamente com a baixa eficiência do detetor nessa região torna impossível detetar os raios-X característicos para baixas energias [40].

O espectrómetro de EDXRF é constituído por uma fonte de excitação, um suporte para a amostra e um sistema de deteção. O detetor de estado sólido é capaz de medir e isolar as diferentes energias (da radiação característica) proveniente da amostra [36], com resoluções que vão desde os 500 eV até aos 120 eV para os detetores mais recentes. O sinal obtido é um impulso de tensão, o qual é amplificado e processado no analisador multicanal, relacionando a energia dos fotões (keV) com a carga coletada nos elétrodos do detetor. Por fim, através de processos de quantificação é possível obter valores de concentração dos vários elementos presentes na amostra [38].

Neste trabalho foram utilizadas duas montagens experimentais, EDXRF com geometria triaxial e μ -EDXRF.

3.4.1 μ -EDXRF

A μ -EDXRF é uma variante do método EDXRF que permite a análise da distribuição elementar de amostras com pequenas partículas não homogéneas, inclusões ou amostras de forma irregular. Esta técnica permite a realização de medições em vácuo, possibilitando assim uma melhor deteção de elementos de baixo Z , uma vez que estes não são absorvidos no ar [38].

São utilizados policapilares óticos de raios-X com o intuito de restringir a radiação proveniente do tubo de raios-X numa pequena região na escala dos μm . Estes são baseados no fenómeno de reflexão total, em que dentro dos capilares os feixes de raios-X propagam-se, refletindo totalmente, sem sofrer atenuação ou dispersão [47]. Deste modo é possível a análise de amostras com uma área muito reduzida possibilitando a obtenção de espectros pontuais e a determinação da distribuição elementar (mapas elementares) com alta resolução espacial [48]. Na figura 3.6 encontram-se representados tubos policapilares que são constituídos por múltiplos capilares óticos no seu interior.

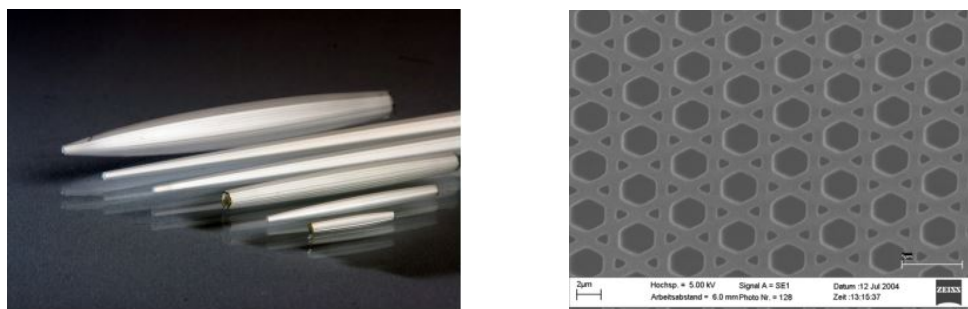


Figura 3.6: Esquema ilustrativo dos capilares óticos de raios-X. À esquerda, encontram-se representados os tubos capilares e, à direita, o interior de um tubo (adaptado de [38]).

A figura 3.7 ilustra a posição da fonte excitação, amostra e do detector num equipamento de μ -EDXRF. O policapilar ótico abrange um grande ângulo em relação à fonte de radiação e concentra a mesma numa região muito reduzida da amostra [38].

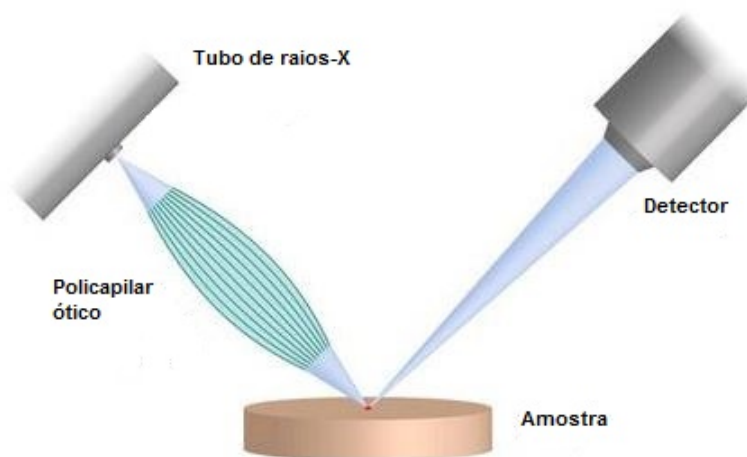


Figura 3.7: Esquema ilustrativo da posição da fonte excitação, amostra e do detector no equipamento de μ -EDXRF. (adaptado de [38]).

O espectrómetro de μ -EDXRF usado neste trabalho é o espectrómetro M4 TornadoTM da Bruker (Alemanha) descrito com detalhe na secção 4.3.

3.4.2 EDXRF com geometria triaxial

Estudos mostram que a melhor geometria para o espectrómetro de EDXRF, de modo a obter a melhor relação sinal/ruído fundo é a geometria triaxial [47, 49]. Esta disposição permite obter uma fonte quase monocromática, através da seleção de um alvo secundário e, deste modo, obter melhores condições de ionização [50].

A radiação proveniente da fonte de raios-X interage com o alvo secundário, funcionando este como um filtro polarizador, e a radiação secundária irá propagar-se perpendicularmente ao feixe da fonte. De seguida, os raios-X interagem com a amostra e o detector de radiação é colocado a um ângulo de 90° , ortogonal ao plano criado pelo feixe da fonte

de raios-X e ao feixe disperso pelo alvo secundário [47]. A componente de *Bremsstrahlung* é eliminada quando a radiação incidente sobre o alvo secundário é dispersa a um ângulo de 90° exatamente. Assim, praticamente nenhuma radiação de *Bremsstrahlung* proveniente do tubo de raios-X interage com o detetor o que leva um aumento da relação sinal/ruído [46].

Esta geometria também provoca a redução da radiação de fundo, pois a radiação dispersa pelos efeitos Compton é um mínimo de intensidade para um ângulo de difusão de 90°, diminuindo a intensidade da radiação secundária que chega ao detetor e assim uma melhoria dos limites de detecção [46, 50].

Na figura 3.8 encontra-se representado o esquemático de um espectrómetro de EDXRF com geometria triaxial. O espectrómetro usado neste trabalho é descrito com detalhe na secção 4.4.

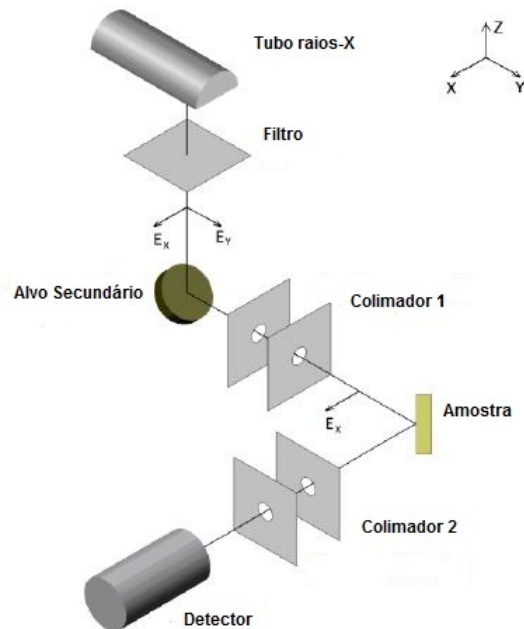


Figura 3.8: Esquema ilustrativo da montagem EDXRF com geometria triaxial composto pela fonte de excitação, filtro, alvo secundário, amostra, colimadores e o detetor (adaptado de [46]).

3.5 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) pode-se definir como a quantidade de massa ou concentração mínima de um elemento detetado numa amostra, expresso em $\mu\text{g/g}$. Este é calculado de acordo com a equação 3.2 [47]:

$$DL = \frac{3C_i\sqrt{N_b}}{N_p} \quad (3.2)$$

onde,

C_i corresponde à concentração do elemento i ;

N_b o número de contagens do fundo;

N_p o número de contagens relativamente ao pico do elemento;

3.6 Espectro caraterístico

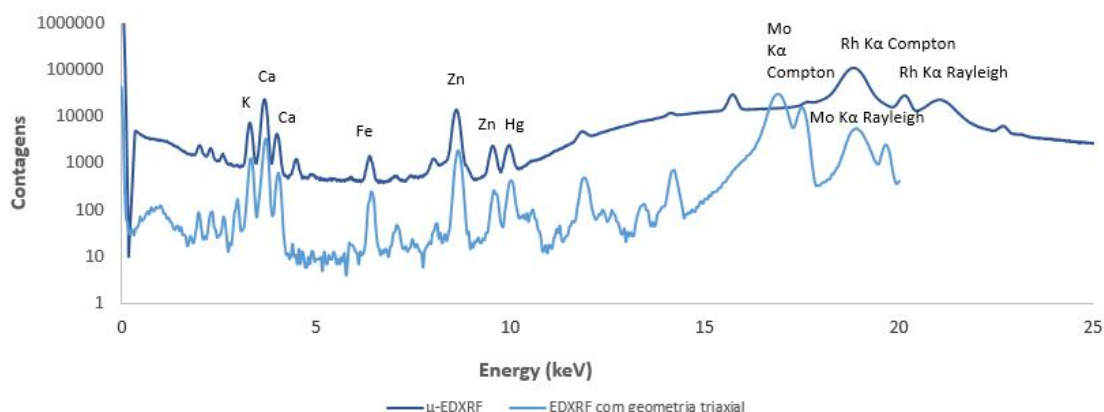


Figura 3.9: Sobreposição do espectro caraterístico de EDXRF com geometria triaxial com μ -EDXRF obtido no presente estudo para uma amostra de peixe-zebra do grupo exposto a uma concentração nominal de 200 $\mu\text{g/L}$.

Na figura 3.9 encontra-se representada a sobreposição de espectros caraterísticos obtidos por EDXRF com geometria triaxial e μ -EDXRF de uma amostra obtida neste estudo.

Este espectro apresenta a seguinte configuração devido à radiação de fundo proveniente da radiação de *Bremsstrahlung*, explicado em detalhe na secção 3.2.

A região central (entre 2 keV e 15 keV) corresponde aos picos caraterísticos dos elementos presentes na amostra sobrepostos com a radiação de fundo. Uma vez que corresponde aos picos característicos, esta será a região de interesse para análise. Através de uma análise qualitativa é possível a identificação dos vários elementos presentes por comparação do valor da energia dos picos caraterísticos. [44].

Na gama de altas energias (região à direita do espectro, a partir de 15 keV), encontram-se os picos de dispersão sobrepostos com o pico caraterístico do Ródio (Rh), tendo em conta que este elemento constitui o material do alvo do tubo de raios-X do espectrómetro de μ -EDXRF utilizado neste estudo. No caso do espectro obtido por EDXRF com geometria triaxial e, como o material do alvo secundário do tubo de raios-X deste espectrómetro é constituído por Molibdénio (Mo), encontram-se sobrepostos os picos de dispersão com o pico caraterístico deste elemento. Estes picos correspondem à difusão elástica (Rayleigh) e inelástica (Compton). Tal como descrito na secção 3.3.3 a dispersão de Compton aumenta com a diminuição do número atómico e como a amostra em estudo é uma amostra

biológica composta por elementos leves, o pico de Compton é superior ao de Rayleigh [46].

Enquanto que na região de baixas energias (à esquerda do espectro, inferior a 2 keV), os picos devem-se principalmente aos efeitos de escape dentro do detetor e ao ruído eletrónico do detetor [46].

Contudo, podem ocorrer artefactos durante o processo de deteção, nomeadamente os picos de escape e picos de soma. Estes artefactos podem originar degradação do sinal detetado, o que pode aumentar a radiação de fundo.

Os picos de soma ocorrem quando dois fótons são detetados simultaneamente e origina um pico com uma energia igual à soma dos dois.

Os picos de escape verificam-se quando um fóton de raios-X caraterísticos do material do detetor escapa do detetor e provoca a deteção de um pico com energia inferior à energia do fóton incidente [46].

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Bioensaio de exposição

Neste trabalho, foram analisados peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos de ambos os sexos, obtidos através de importadores nacionais (AquaPlante, Portugal), mantidos em aclimação sob condições laboratoriais, durante 2 semanas, antes do início dos ensaios no Biotério do Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente da FCT-UNL. Após o período de adaptação, foram distribuídos diversos espécimens de *Danio rerio* ($n=34$) com um peso médio de 0.2 g e com um comprimento médio de 3 cm, aleatoriamente em três tanques (100 L de volume com arejamento contínuo) de exposição sob as seguintes condições: água filtrada, pH de 7.2 ± 0.4 ; com uma temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$; O_2 dissolvido $>6\text{mg/L}$ amónia inferior a $0,05 \mu\text{g/L}$.

Foram estudados três grupos contaminados ($n=9$) expostos a uma solução de Cloreto de Hg (II) (HgCl_2 , Sigma-Aldrich, 99.5% puriss p.a.) diretamente na água com diferentes concentrações determinadas previamente ($100 \mu\text{g/L}$, $200 \mu\text{g/L}$ e $400 \mu\text{g/L}$). Utilizou-se um tanque adicional com água "limpa" com remoção prévia de cloro como controlo.

Foi realizado um ensaio semi-estático, com renovação do meio a cada 24 horas, durante 7 dias de exposição. Durante o período de exposição os peixes foram alimentados *ad libitum* diariamente com flocos comerciais (Eco vita). Os tanques foram monitorizados diariamente para controlo de pH, temperatura e mortalidade, apenas o tanque contaminado com uma concentração de $400 \mu\text{g/L}$ apresentou mortalidade (33,3% , consultar apêndice A). Após o período experimental, os peixes foram eutanasiados em gelo por secção cervical com auxílio de um bisturi e congelados a -80°C até análise posterior.

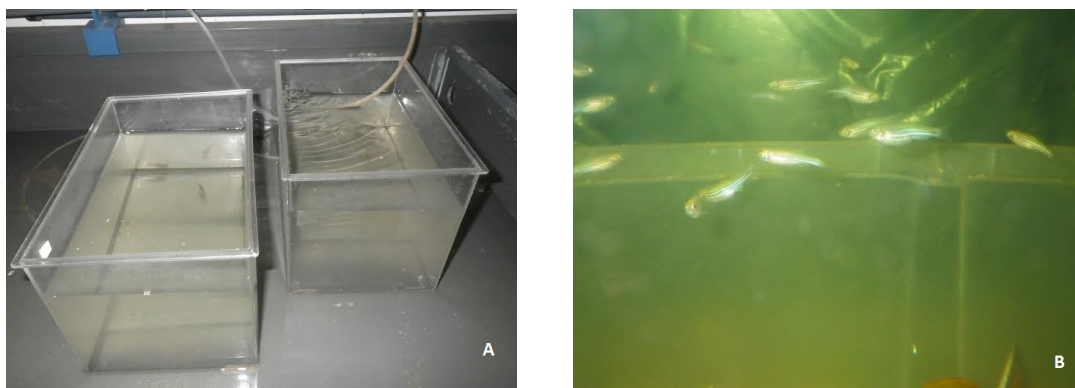


Figura 4.1: Tanques de bioensaio de exposição ao Hg (A) e o modelo biológico *Danio rerio* (B).

É de salientar que foram realizados dois bioensaios preliminares de exposição antes do bioensaio final que foi utilizado neste estudo, com o intuito de otimizar o procedimento experimental.

4.2 Preparação das amostras

4.2.1 Análise por μ -EDXRF e EDXRF

Para analisar as amostras através dos métodos de μ -EDXRF e EDXRF com geometria triaxial, procedeu-se à seguinte preparação. As amostras foram cortadas transversalmente com o auxílio de uma lâmina de barbear e secas através num liofilizador durante cerca de 24 h. Depois de secas, foram montadas em slides (50×50 mm) onde se colocou uma folha de mylar. Nesta folha e com o auxílio de um pouco de cola, de marca UHU[®], que não contém nenhum elemento capaz de ser detetado pelas técnicas usadas, adicionou-se um peixe-zebra, sendo este devidamente identificado com o número e com a concentração a que foi exposto. Pode-se observar esta montagem na figura 4.2.



Figura 4.2: Montagem da amostra em estudo para análise por μ -EDXRF e EDXRF com geometria triaxial.

4.2.2 Análise por ICP-AES

Após as amostras terem sido analisadas por μ -EDXRF e EDXRF com geometria triaxial fez-se uma seleção das amostras para serem analisadas por ICP-AES. Estas análises foram efetuadas pelo laboratório de Análises Requirnte do Departamento de Química da FCT-UNL através de uma curva de calibração (anexo D) obtida para materiais de referência. A precisão desta técnica foi verificada pela análise de material biológico certificado (Standard Reference Material, SRM 1556b - Oyster Tissues, NIST). O total de Hg ($\mu\text{g/g}$) medido no material de referência digerido (Hg total: 0.0404 ± 0.0082) mostrou estar dentro do limite dos valores certificados (Hg total: 0.0371 ± 0.0013). Esta técnica permite a determinação da concentração de vários elementos com um limite de deteção inferior a $0.1 \mu\text{g/L}$.

O critério de seleção utilizado foi ter o mesmo número de fêmeas e machos, ou seja, foram analisadas duas amostras de cada sexo do grupo de controlo, do grupo exposto a $100 \mu\text{g/L}$, a $200 \mu\text{g/L}$ e do grupo exposto a $400 \mu\text{g/L}$ apenas se analisou dois machos e uma fêmea, num total de 15 amostras. Procedeu-se à pesagem das amostras secas e tendo em conta que a técnica apenas analisa amostras em solução aquosa foi necessário digeri-las em ácido nítrico (HNO_3 , Sigma-Aldrich, Alemanha), durante 72 h (60°C). Adicionou-se em cada frasco para recolha de amostras, devidamente identificado, 2 mL de HNO_3 (69 % puriss p.a.) e de seguida o peixe em estudo. Após a digestão completa da matriz orgânica, foi adicionado $10 \mu\text{l}$ de H_2O_2 a cada uma das amostras e per fez-se para um volume final de 10 mL com H_2O destilada.

4.3 Espectrómetro de μ -EDXRF

As amostras, previamente preparadas, foram analisadas por μ -EDXRF utilizando o espectrómetro M4 TornadoTM da Bruker (Alemanha), de modo a executar o mapeamento do peixe-zebra e, assim determinar a concentração de Hg e outros elementos traço nos vários órgãos dos animais. Este espectrómetro é constituído por uma câmara de vácuo, por um único tubo de raios-X com ânodo de ródio (Rh) alimentado por um gerador de alta tensão de baixa potência e arrefecido por ar, com capacidade de fornecer 50 kV e uma corrente máxima de $600 \mu\text{A}$ [51]. O feixe de raios-X é focado por um feixe policapilar possibilitando uma resolução espacial de cerca de $25 \mu\text{m}$, permitindo assim realizar mapeamentos com excelente resolução. Apresenta capacidade de detetar a fluorescência através de um detetor dispersivo em energia *Silicon Drift Detector* (SDD) com uma área sensível de 30 mm^2 e resolução de energia de 142 eV para a risca $K\alpha$ do Manganês (Mn) e um conjunto de filtros com o intuito de filtrar a radiação proveniente do tubo de raios-X [26] [52].

As análises elementares dos tecidos de peixe-zebra foram executadas com uma tensão de 50 kV e uma corrente de $600 \mu\text{A}$, com a utilização do filtro $100 \mu\text{m Al}/50 \mu\text{m Ti}/25 \mu\text{m Cu}$. Estas análises ocorreram em vácuo, sob uma pressão de 20 mbar, apenas em um modo de funcionamento, o de mapeamento. O tempo de aquisição de cada amostra foi

aproximadamente de 180 segundos.

4.4 Espectrómetro de EDXRF com geometria triaxial

Neste trabalho, as amostras também foram analisadas por EDXRF com geometria triaxial. Este espectrómetro consiste num tubo de raios-X comercial, com um ânodo de tungstênio e um alvo secundário de molibdênio (Mo) (fonte de excitação de $K\alpha$ e $K\beta$ de 17,44 e 19,60 keV , respetivamente) [53]. O tubo de raios-X, o alvo secundário e a amostra foram colocados com uma geometria triaxial com o intuito de reduzir a radiação de fundo aproveitando-se do efeito de polarização do feixe incidente [54] [51]. A radiação característica emitida pelos elementos presentes na amostra é detetada por um detetador de Silício(Li) arrefecido com nitrogénio líquido com uma área ativa de 30 mm² e uma janela de berílio de 8 μ m da Oxford Instruments (Inglaterra) [51]. Um colimador de prata foi colocado em frente ao detetador a fim de restringir a área efetiva do mesmo [50].

O gerador de raio-X foi operado com uma tensão de 50 kV e uma corrente de 20 mA e com um tempo de aquisição de 1000 segundos por espectro.

4.5 Processo de quantificação

De modo a obter os valores da concentração relativa dos vários elementos presentes na amostra analisada, é necessário recorrer a processos de quantificação. O processo de quantificação utilizado neste estudo tem como base o método de parâmetros fundamentais, descrito pela equação 4.1. Esta equação relaciona a intensidade do pico de um dado elemento em função da concentração desse mesmo elemento na amostra [54],

$$I_i = I_0 K_i A_i m C_i \quad (4.1)$$

isto é,

I_i é a intensidade da radiação X característica do elemento i na amostra;

I_0 é a intensidade inicial da radiação;

K_i é o fator de calibração experimental;

A_i é o fator de atenuação;

m (g/cm²) é a massa da amostra por unidade de área;

C_i (μ g/g) é a concentração do elemento i na amostra.

K_i depende das características da montagem experimental associada a cada equipamento utilizado (geometria do espectrómetro e a eficiência do detetador) e, enquanto que I_0 depende da energia de funcionamento do tubo de raios-X. Relativamente ao A_i obtido através da matriz virtual de três elementos, neste caso uma matriz de elementos leves constituída por carbono, oxigénio e hidrogénio.

No processo de quantificação por μ -EDXRF recorreu-se a amostras padrão fundamentais nomeadamente, Fish tissue [55] e Oyster tissue [56] para fins de calibração.

4.6 Incertezas associadas

Como qualquer outro método, a análise por EDXRF está associada a incertezas. Esta resulta da combinação de incertezas estatísticas com incertezas sistemáticas. No que diz respeito às incertezas estatísticas, estão relacionada com flutuações aleatórias associadas à medição da intensidade dos picos de raios-X. Enquanto que as incertezas sistemáticas estão associadas ao funcionamento do equipamento e às próprias amostras, como a variação da heterogeneidades e espessura das mesmas [57].

Primeiramente procedeu-se ao cálculo da média ponderada (\bar{X}_p), uma vez que as medições efetuadas da concentração elementar são diferentes de ponto para ponto. Através da expressão 4.2 é possível calcular a mesma [58]:

$$\bar{X}_p = \frac{1}{\sum_{i=1}^N \mu(X_i)} \times \sum_{i=1}^N \mu(X_i) \times x_i \quad (4.2)$$

onde,

$\mu(X_i)$ representa a incerteza associada à medição de cada ponto para cada elemento i ;

x_i a incerteza experimental;

X_i a concentração do elemento i ;

N o número de medições efetuadas.

A incerteza associada à média ponderada encontra-se descrita na equação 4.3 e, é obtida, através da lei da propagação das incertezas:

$$\mu(\bar{X}_p) = \frac{1}{\sum_{i=1}^N \mu(X_i)} \sqrt{\sum_{i=1}^N \mu(X_i)^4} \quad (4.3)$$

A incerteza final representada na equação 4.4 é obtida através da raiz quadrada da soma quadrática entre a incerteza associada à média ponderada e o desvio padrão (σ) resultante das várias medições efetuadas:

$$\mu(\bar{X}_f) = \sqrt{(\mu(\bar{X}_p))^2 + \sigma^2} \quad (4.4)$$

4.7 Análise de biomarcadores

4.7.1 Extração de proteínas

As amostras foram homogeneizadas em 2 mL de solução salina de tampão (PBS, pH 7.4) com o auxílio de um homogeneizador, T10 basic Ultra Turrax® (Ika, Alemanha) [29]. De seguida procedeu-se à centrifugação durante 10 minutos a 4°C. Após este período, as amostras foram congeladas (-80 °C) e armazenadas até análise posterior. Para efeito de normalização, os resultados foram divididos pela quantidade total de proteínas, calculado pelo método de Bradford [59] com o intuito de normalizar os resultados dos vários biomarcadores [28].

4.7.2 Glutathione-S-Transferase (GST)

O estudo enzimático da GST (EC 2.5.1.18) foi realizado de acordo com Habig *et al.* (1974) [60] e otimizado para microplacas de 96 poços. Utilizou-se o substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), de modo a reagir com a enzima. Após a leitura da absorvância a 340 nm foi calculada a atividade da enzima de acordo com o descrito em Madeira *et al.* [61].

4.7.3 Catalase (CAT)

O estudo enzimático da CAT (EC 1.11.1.6) foi efetuado de acordo com os procedimentos descritos anteriormente por Johansson e Borg (1988) adaptados para uma microplaca de 96 poços (Greiner, Alemanha) [62]. Para produzir a curva de calibração foram utilizados padrões de formaldeído (0 a 150 μ M). A atividade enzimática foi calculada considerando que, uma unidade de catalase é definida como a quantidade que irá causar a formação de 1,0 nmol de formaldeído por minuto a 25 °C [29].

4.7.4 Ensaio de Lipoperoxidação

O ensaio de lipoperoxidação realizou-se com base no protocolo de TBARS, substâncias reativas ao TBA (Uchiyama e Mihara, 1978) [33]. As amostras foram lidas a 530 nm e quantificadas através de uma curva de calibração construída com padrões de MDA (0 a 100 μ M/ml) (Merck Millipore, Portugal) [28].

4.7.5 Determinação da Vitelogenina (VTG)

A determinação da concentração da VTG foi efetuada através do ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com o protocolo adaptado a partir de Denslow *et al.* (1999) [63]. Foi utilizado um anticorpo monoclonal específico (Biosense, Noruega) contra a VTG da carpa, que também reage com a VTG do peixe-zebra [35]. Assim, esta proteína foi utilizada para determinar o sexo dos animais em estudo e avaliar a indução da síntese desta proteína nos animais expostos ao Hg.

4.7.6 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtido foi realizada através do software Statistica (Statistica versão 8.0 Statsoft Inc. , Tulsa, OK , EUA, 2007) com um nível de significância de 5% ($p < 0.05$) em todos os testes (anexo F). Testes U de Mann-Whitney foram usados para detetar diferenças significativas entre organismos controlo e os expostos às diferentes concentrações de Hg testadas, para a peroxidação lipídica, catalase, glutathione-S-transferase e vitelogenina como para as técnicas de EDXRF e ICP-AES. Contudo, não foi possível efetuar esta análise para o estudo por sexos, uma vez que os dados não eram suficientes.

ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados dos estudos realizados, bem como a discussão e análise dos mesmos. Estes serão apresentados primeiramente numa análise qualitativa e seguidamente numa análise quantitativa.

5.1 Análise Qualitativa

5.1.1 Distribuição Elementar nos tecidos de *Danio rerio*

Para determinar os tecidos alvo do peixe-zebra, ou seja, os locais preferenciais de acumulação de Hg, utilizaram-se as imagens dos mapeamentos adquiridos através de μ -EDXRF. Nas figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 é possível observar a distribuição simultânea de vários elementos, respetivamente cálcio (Ca), ferro (Fe), mercúrio (Hg) e zinco (Zn) ao longo do peixe. Esta distribuição qualitativa é semelhante para todas as amostras estudadas, ou seja, independentemente da concentração de Hg a que estão expostas (100 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$ ou 400 $\mu\text{g/L}$), a distribuição elementar segue um padrão comum.

A análise dos resultados obtidos mostra que o esqueleto ósseo e as barbatanas são constituídas principalmente por Ca, enquanto que o olho é composto maioritariamente por Zn. No que diz respeito ao Fe, este encontra-se em grande concentração nas brânquias, contudo, em certos mapeamentos também é possível verificar a presença deste elemento no coração e no rim.

Relativamente ao Hg, este elemento acumula-se principalmente na área visceral, isto é, gónadas, intestino e fígado. A bioacumulação de Hg nas gónadas e, sendo estas lipofílicas, está relacionada com a afinidade dos metais aos lípidos. Tal como é sabido, o fígado é um órgão essencial para a biotransformação de xenobióticos e também está envolvido na excreção de metais. Este apresenta capacidade de acumular metais e outros xenobióticos, originando assim elevados níveis de bioacumulação [64]. Por estar em contacto direto com

a água contaminada, as brânquias são a principal via de entrada de Hg para o organismo. O Hg presente na água é absorvido e, através da corrente sanguínea, é transportado para os vários órgãos e tecidos. A acumulação de Hg nos diferentes órgãos e tecidos dependerá da afinidade do Hg inorgânico para com estes [65]. Por fim, também ocorre deposição no cérebro, com exceção dos peixes expostos a $100 \mu\text{g/L}$, especificamente na barreira hematoencefálica, tal como se observa nas figuras 5.3 e 5.4. Esta acumulação ocorre devido ao facto do Hg utilizado no estudo ser Hg inorgânico e este não possuir a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo o dano neurológico menor [15].

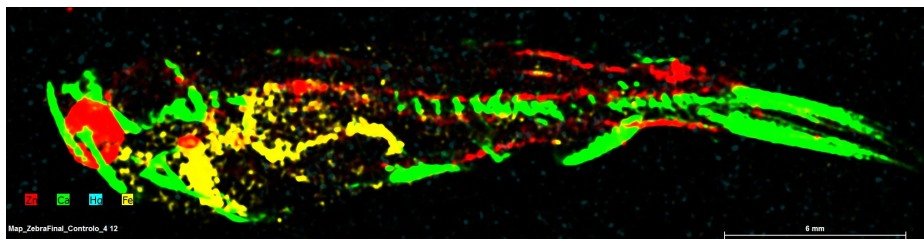


Figura 5.1: Mapeamento elemental do peixe-zebra relativamente ao grupo de controlo (não exposto a Hg).

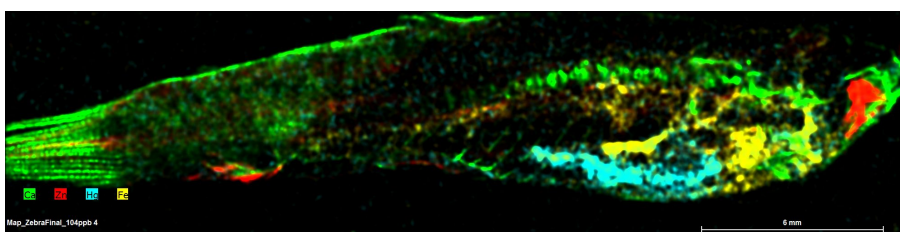


Figura 5.2: Mapeamento elemental do peixe-zebra relativamente ao grupo contaminado com concentração nominal de $100 \mu\text{g/L}$ de HgCl_2 .

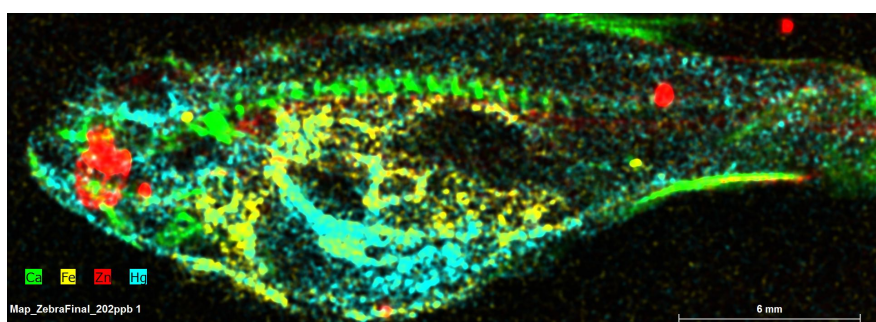


Figura 5.3: Mapeamento elemental do peixe-zebra relativamente ao grupo contaminado com concentração nominal de $200 \mu\text{g/L}$ de HgCl_2 .

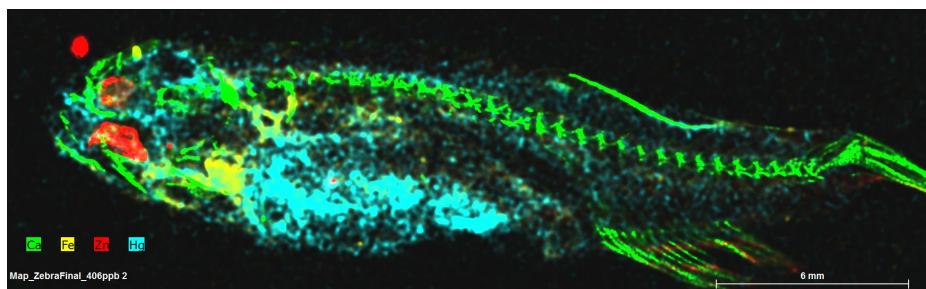


Figura 5.4: Mapeamento elemental do peixe-zebra relativamente ao grupo contaminado com concentração nominal de 400 $\mu\text{g/L}$ de HgCl_2 .

De acordo com as figuras analisadas, é possível definir as brânquias, o cérebro e a área visceral como os tecidos com maior afinidade para bioacumulação de Hg. Estes três tecidos serão, portanto, estudados em detalhe na secção 5.3.

5.2 Análise Quantitativa

As imagens dos mapeamentos obtidas por μ -EDXRF mostram exclusivamente a distribuição elemental dos vários elementos ao longo do peixe. Com o intuito de quantificar os resultados obtidos procedeu-se ao processo de quantificação descrito na secção 4.5.

5.2.1 Análise por EDXRF com geometria triaxial

Primeiramente, realizou-se um estudo por EDXRF com geometria triaxial devido ao facto de esta técnica permitir a deteção de elementos pesados, como o Hg, com limites de deteção muito baixos, abaixo dos 10 $\mu\text{g/g}$.

Os resultados obtidos, representados na figura 5.5, mostram que entre os quatro grupos estudados (controlo, 100 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$ e 400 $\mu\text{g/L}$), não se verificam alterações relevantes na concentração elemental dos vários elementos presentes das amostras analisadas. Os dois elementos onde as alterações da concentração são mais acentuadas são o Fe e o Hg. O Fe apresenta uma ligeira diminuição da sua concentração nas amostras expostas ao Hg, comparativamente ao grupo de controlo (não exposto ao Hg). Isto poderá ser explicado uma vez que o HgCl_2 produz diversas alterações patológicas no organismo, nomeadamente uma redução na hemoglobina no sangue [66] e, assim, redução do Fe.

A concentração de Hg encontra-se representada na figura 5.6, onde se observa uma concentração superior na amostra exposta a 200 $\mu\text{g/L}$ em comparação com as amostras expostas a 100 $\mu\text{g/L}$ e 400 $\mu\text{g/L}$. É notória a diferença entre as amostras expostas a 100 $\mu\text{g/L}$ e 200 $\mu\text{g/L}$, tendo ocorrido cerca do dobro de bioacumulação para esta última, quando comparada à primeira.

O grupo de controlo apresenta concentrações de Hg abaixo do limite de deteção do espectrómetro e, por este motivo, não é detetado. Os dados associados às figura 5.5 e 5.6 encontram-se tabelados no apêndice B.

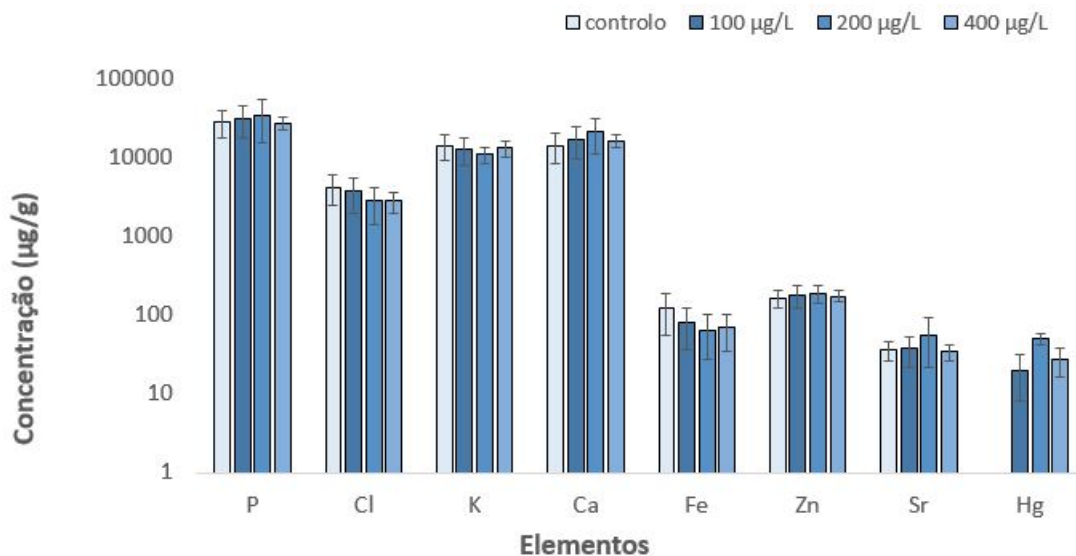


Figura 5.5: Comparação da concentração elementar média obtida nas amostras estudadas dos diferentes grupos de contaminação.

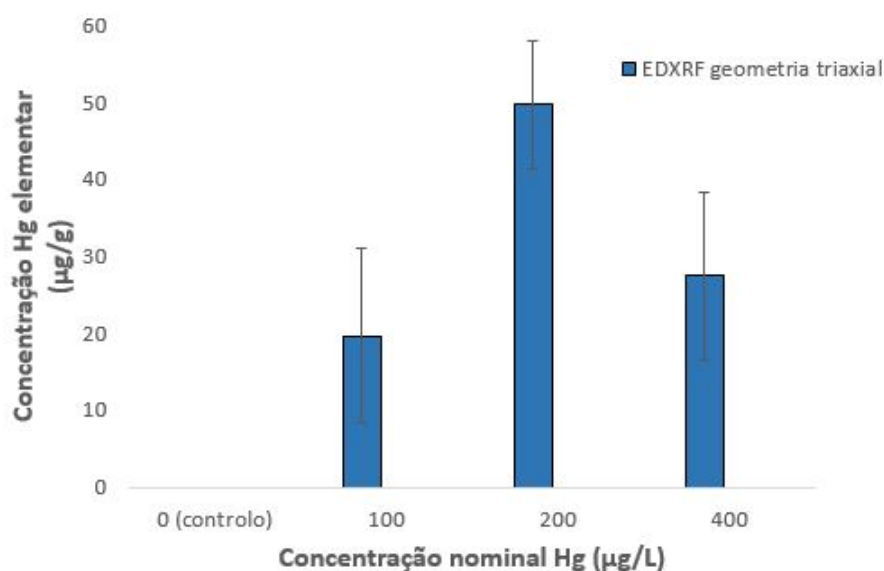


Figura 5.6: Comparação da concentração elementar média obtida de Hg nas amostras estudadas dos diferentes grupos de contaminação.

5.3 Análise por μ -EDXRF

5.3.1 Análise por tecidos alvos

Após definir quais os tecidos alvo, através das imagens de mapeamento, procedeu-se à quantificação das três áreas em estudo (brânquias, área visceral e cérebro).

Com base nos resultados obtidos por μ -EDXRF, é possível observar que a concentração de Hg nos tecidos alvos é significativamente superior no grupo exposto a 200 µg/L ($p < 0.05$).

A área visceral revela ser o tecido alvo onde ocorreu uma maior bioacumulação de Hg em todos os grupos expostos. Tendo em conta esta inclui as gónadas, o intestino e o fígado e uma vez que estes apresentam um tamanho reduzido, foi impossível quantificar individualmente cada um deles. Estes resultados estão de acordo com as imagens de mapeamento obtidas 5.2, 5.3 e 5.4 e o trato gastrointestinal absorve facilmente o HgCl_2 , apresentando uma bioacumulação superior nesta área [11]. O grupo exposto a 200 $\mu\text{g/L}$ apresenta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) em comparação com os restantes grupos. No entanto, ao contrário do expectável, o grupo exposto a 100 $\mu\text{g/L}$ apresenta valores de concentração superiores ao grupo exposto a 400 $\mu\text{g/L}$, contudo essa diferença não é significativa ($p > 0.05$).

Relativamente às brânquias, não se verifica uma variação significativa entre os grupos expostos a 100 $\mu\text{g/L}$ e 400 $\mu\text{g/L}$, contrariamente ao que ocorre entre o grupo exposto a 200 $\mu\text{g/L}$ e os restantes ($p < 0.05$). Por fim, os níveis de bioacumulação no cérebro no grupo exposto a 100 $\mu\text{g/L}$ são muito reduzidos em comparação com os outros dois grupos estudados, o que vem confirmar os resultados observados na figura 5.2. O grupo exposto a 200 $\mu\text{g/L}$ apresenta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) comparativamente aos expostos a 100 $\mu\text{g/L}$ e 400 $\mu\text{g/L}$.

No grupo exposto a 200 $\mu\text{g/L}$, em todos os tecidos alvo, registou-se um fator de 1×10^3 de bioacumulação, isto é, ocorreu um aumento da concentração deste elemento cerca de 1000 vezes. A concentração obtida é portanto 1000 vezes superior à exposta na água. Quanto ao grupo exposto a 100 $\mu\text{g/L}$, na área visceral, registou-se um fator de 1×10^3 de bioacumulação, enquanto que nas brânquias só se observou um fator de 5×10^2 e no cérebro 1×10^2 . O grupo exposto a 400 $\mu\text{g/L}$ bioacumulou num fator de $3,5 \times 10^2$ na área visceral, $1,8 \times 10^2$ nas brânquias e 1×10^2 no cérebro.

A bioacumulação de Hg resultou num aumento significativo deste elemento em todos os tecidos, principalmente na área visceral e nas brânquias com o seguinte padrão de bioacumulação: área visceral > brânquias > cérebro. Segundo Risher *et al.* [16], o rim é o principal órgão de bioacumulação de Hg inorgânico. No entanto, o presente estudo mostra que o Hg acumulou principalmente na área visceral e nas brânquias. Os estudos desenvolvidos por Elia *et al.* [67] e Monteiro *et al.* [68], vão ao encontro dos resultados obtidos, na medida em que os peixes acumulam Hg inorgânico principalmente no fígado e nas brânquias.

De um modo geral, o grupo exposto a 400 $\mu\text{g/L}$ foi o grupo onde a bioacumulação de Hg foi menor, podendo ser uma consequência do efeito do Hg sobre o metabolismo dos peixes.

Na figura 5.7 encontram-se representados os resultados obtidos e os respetivos dados podem ser consultados na tabela C.1 do apêndice C.

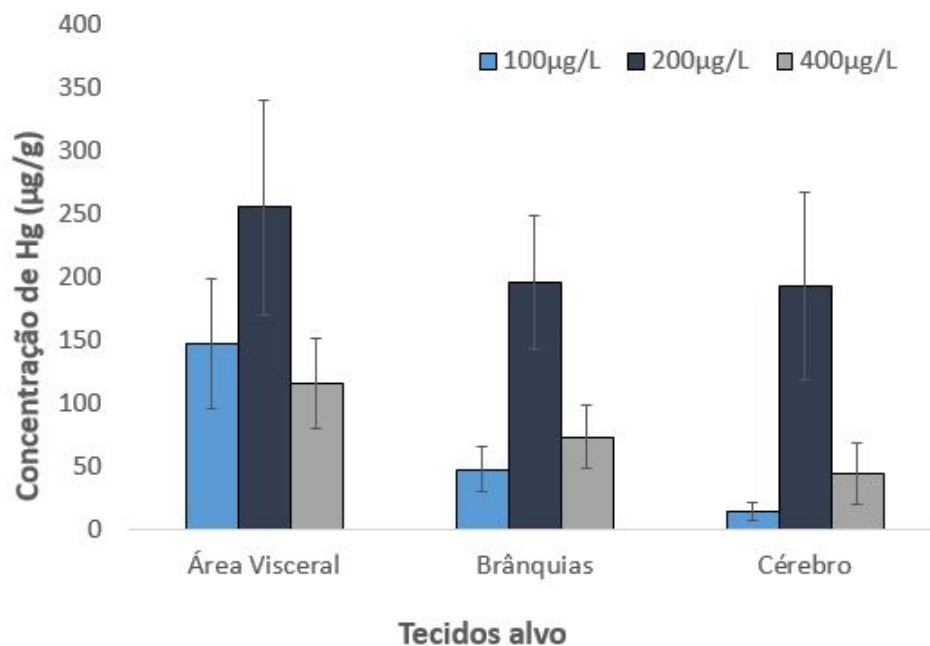


Figura 5.7: Comparação da concentração elementar média de Hg obtida para os três grupos em estudo, em função dos tecidos alvo.

É de salvaguardar que ao preparar as amostras foi necessário cortá-las transversalmente e, tendo em conta o tamanho reduzido do peixe, é difícil obter um corte perfeito e simétrico. Assim, as áreas analisadas e até o tamanho relativo dos órgãos selecionados de amostra para amostra poderão não ser exatamente os mesmos, daí as barras de incerteza serem maiores do que o desejado.

Na figura 5.8 encontra-se representada a distribuição das amostras dos grupos estudados tendo em conta a afinidade aos tecidos alvo. Pela análise desta é possível concluir a fraca afinidade do grupo exposto a 100 µg/L relativamente ao cérebro. Comparativamente aos restantes, o grupo exposto a 200 µg/L apresenta uma bioacumulação superior para qualquer um dos tecidos, tendo maior afinidade para a área visceral.

Ao analisar as amostras individualmente, é possível observar as diferenças entre as amostras estudadas. Essa diferença poderá dever-se a vários fatores, tais como a variabilidade intraespecífica, sexo dos animais, património genético e condição fisiológica. Ao comparar um peixe pertencente ao grupo 200 µg/L e outro ao grupo de 400 µg/L verifica-se que os mesmos apresentam valores de bioacumulação de Hg semelhantes. Tal também acontece entre outros dois peixes, pertencentes ao grupo de 100 µg/L e 200 µg/L. Estes casos em particular reforçam a existência de uma diferença significativa entre as amostras analisadas expostas à mesma concentração nominal de Hg na água.

O erro de medição associado a cada amostra é muito reduzido (ordem 10^{-8} µg/g) e, por este motivo não é representado na figura 5.8.

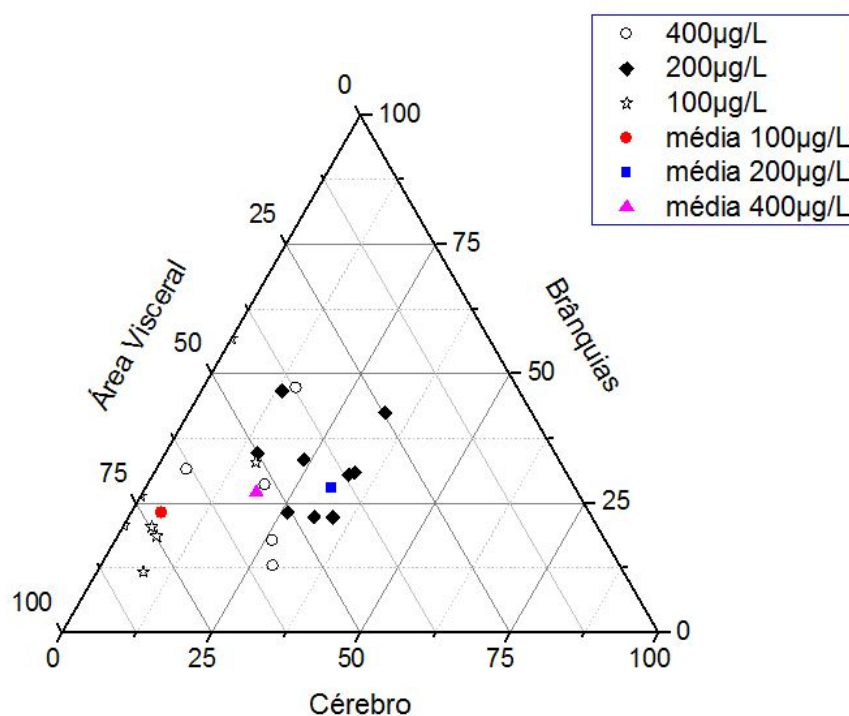


Figura 5.8: Distribuição das amostras em estudo em função da afinidade aos tecidos alvos (brânquias, cérebro, área visceral). Note-se que cada ponto corresponde a um único peixe.

5.3.2 Análise por Sexos

Tal como já foi referido, o sexo dos peixes é um dos fatores que pode influenciar a bioacumulação de Hg nos diferentes tecidos alvo. Como tal, efetuou-se um estudo de modo a melhor compreender a influência deste parâmetro. Desta forma, procedeu-se a uma análise dos resultados obtidos separando os indivíduos de acordo com o sexo (machos e fêmeas).

Na figura 5.9 encontram-se representados os valores da concentração elementar média de Hg, na área visceral, de acordo com o sexo dos animais.

A diferença entre sexos é mais acentuada no grupo exposto a 200 $\mu\text{g/L}$, enquanto que nos grupos de 100 $\mu\text{g/L}$ e 400 $\mu\text{g/L}$ a diferença entre sexos não é relevante.

Em relação às fêmeas dos grupos 100 $\mu\text{g/L}$ e 400 $\mu\text{g/L}$ não se verificam alterações consideráveis.

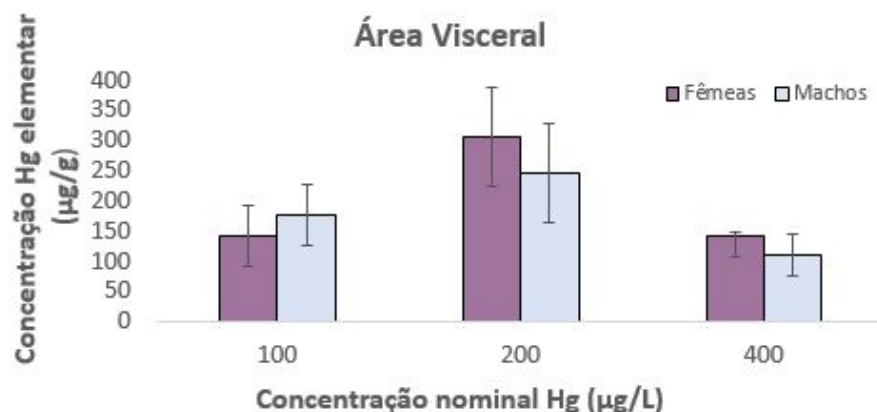


Figura 5.9: Comparação da concentração elementar média de Hg obtida para os três grupos em estudo, em função do sexo dos animais e da área visceral.

No que diz respeito à bioacumulação de Hg nas brânquias, os machos do grupo exposto a 200 µg/L apresentam uma afinidade superior ao Hg. Estes bioacumulam cerca do dobro em relação às fêmeas, como se pode observar na figura 5.10.

Relativamente aos grupos expostos a 100 µg/L e 400 µg/L não se verificam diferenças entre sexos, nem entre grupos.

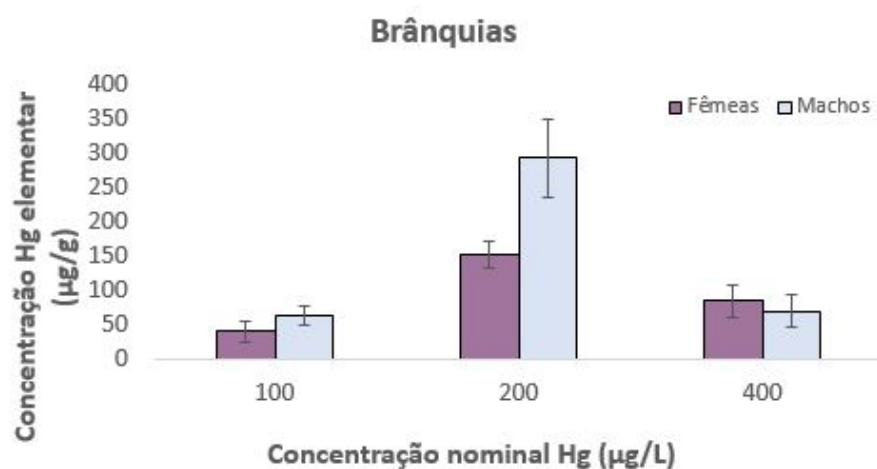


Figura 5.10: Comparação da concentração elementar média de Hg obtida para os três grupos em estudo, em função do sexo dos animais e das brânquias.

Por fim, o cérebro das fêmeas tende a bioacumular mais Hg em relação aos machos. No caso do grupo exposto a 100 $\mu\text{g/L}$, a concentração no cérebro é muito reduzida e os machos não apresentam qualquer tipo de bioacumulação de Hg, o que está de acordo com os mapeamentos observados na secção 5.1.

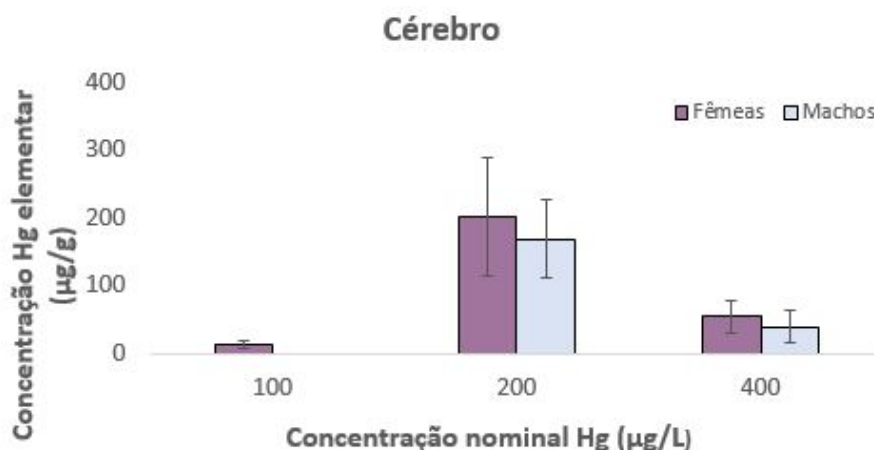


Figura 5.11: Comparação da concentração elementar média de Hg obtida para os três grupos em estudo, em função do sexo do animal e do cérebro.

Contudo, independentemente do sexo, a quantificação elementar de Hg por tecidos alvo apresenta valores superiores no grupo exposto a 200 $\mu\text{g/L}$, tal como observado anteriormente na secção 5.3.1. Os dados relativos às figuras 5.9, 5.10 e 5.11 encontram-se na tabela C.2 do apêndice C.

5.4 Análise por ICP-AES

A análise por ICP-AES foi efetuada utilizando duas fêmeas e dois machos de cada grupo. Com exceção do grupo com concentração nominal de 400 $\mu\text{g/L}$, em que apenas se utilizou uma fêmea, uma vez que entre os restantes peixes do estudo só existia uma.

5.4.1 Estudo bioacumulação de Hg

Com base nos resultados obtidos pela técnica de ICP-AES, à semelhança dos de EDXRF, é possível observar os efeitos de biocumulação do Hg em qualquer um dos grupos expostos (100 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$ e 400 $\mu\text{g/L}$) com exceção do grupo de controlo, que não apresenta Hg.

Ao analisar os dados obtidos, encontra-se uma diferença significativa ($p < 0.05$) dos valores de concentração de Hg do grupo exposto a 100 $\mu\text{g/L}$ relativamente aos outros dois grupos estudados (200 $\mu\text{g/L}$, 400 $\mu\text{g/L}$), tal como observado nos resultados obtidos por EDXRF com geometria triaxial (figura 5.6).

Relativamente aos grupos expostos a 200 $\mu\text{g/L}$ e a 400 $\mu\text{g/L}$ não se verificam diferenças significativas ($p > 0.05$) entre os valores de bioacumulação de Hg.

Estes resultados encontram-se representados na figura 5.12 e os dados tabelados no apêndice D.

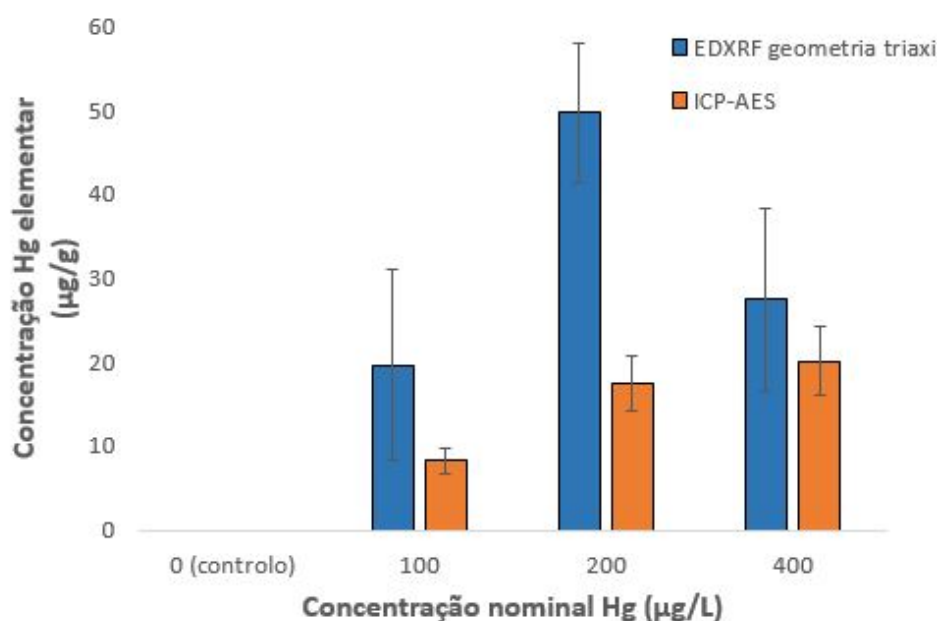


Figura 5.12: Comparação da concentração elementar média de Hg em função da concentração nominal de Hg na água na técnica de EDXRF com geometria triaxial e na técnica de ICP-AES.

5.4.2 Análise da água

Além das amostras de peixe-zebra analisadas, a água dos vários tanques do estudo foi analisada por ICP-AES. Na tabela 5.1 encontra-se a comparação entre as concentrações nominais de Hg na água e as concentrações reais de Hg.

Há uma perda significativa de Hg na concentração nominal de 400 µg/L relativamente à concentração inicial obtida (0 h) mostrando assim que a concentração real a que os peixes estavam expostos não foi exatamente 400 µg/L. Esta perda tão significativa não era esperada e por esse mesmo motivo não foi tida em conta numa análise inicial. Esta poderá dever-se a vários fatores, tais como a acumulação de Hg na matéria orgânica presente na água, bioacumulação de Hg nas bactérias constituintes do filme fino das paredes do aquário e por fim, uma parte do Hg pode ter evaporado, uma vez que este é volátil.

Com exceção da concentração nominal de 400 µg/L, a concentração real obtida é muito próxima da nominal. Ao fim de 24 horas a concentração em todos os casos diminuiu para cerca de metade devido aos fatores referidos anteriormente e por bioacumulação de Hg nos peixes.

A diferença entre as concentrações de Hg na água dos peixes expostos a 200 µg/L e 400 µg/L não é tão significativa como esperado, o que poderá justificar os resultados obtidos na secção 5.4.1.

Tabela 5.1: Comparação da concentração de Hg na água às 0 horas e após 24 horas.

Concentrações nominais ($\mu\text{g/L}$)	Concentrações reais ($\mu\text{g/L}$)	
	0horas	24horas
100	80 ± 5	40 ± 2
200	160 ± 8	90 ± 10
400	260 ± 13	140 ± 11

5.5 Análise de biomarcadores

Realizou-se um estudo complementar com alguns biomarcadores de stress oxidativo, com o intuito de avaliar os efeitos tóxicos do Hg nos peixes. Estes resultados foram obtidos através dos processos descritos na secção 4.7. Os dados das figuras 5.13, 5.14, 5.15 e 5.16 encontram-se no apêndice E.

5.5.1 Enzimas Antioxidantes

Alguns metais podem alterar a atividade de várias enzimas por ligação aos seus grupos funcionais [69]. Quando os animais estão expostos a condições de stress, o que provoca a produção de ROS, estes podem induzir ou inibir as enzimas antioxidantes. Estas diferenças devem-se a vários fatores, tais como o tipo de espécie estudada, o tipo de estudo, o tempo de exposição e a forma química do composto testado [61, 69].

5.5.1.1 GST

Tal como se mostra na figura 5.13 não se registaram alterações significativas ($p > 0.05$) nos níveis da atividade da GST em relação ao grupo de controlo. Esta enzima é fundamental nos processos de desintoxicação de metais, uma vez que esta se pode ligar ao Hg (Hg-GSH) atuando principalmente ao nível do metabolismo hepático. No presente estudo o peixe foi analisado como um todo e não só o seu fígado, o que poderá explicar o facto de não se terem observado alterações significativas entre os vários grupos expostos comparativamente ao grupo de controlo.

Ao contrário dos resultados obtidos no presente estudo, Monteiro *et al.* [68] observou um aumento da atividade desta enzima em alguns órgãos (fígado, coração e brânquias) em comparação com o grupo de controlo de Traíra (*Hoplias malabaricus*), que por sua vez foram previamente alimentados com HgCl_2 . Apesar de ambos os estudos testarem o mesmo composto, estas diferenças podem ser explicadas pelo facto da espécie estudada não ter sido a mesma.

No entanto, estudos de Huang *et al.* [70] mostraram que não ocorreram diferenças nos níveis de GST em larvas e juvenis de solha Japonesa (*Paralichthys olivaceus*) expostos a Hg. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

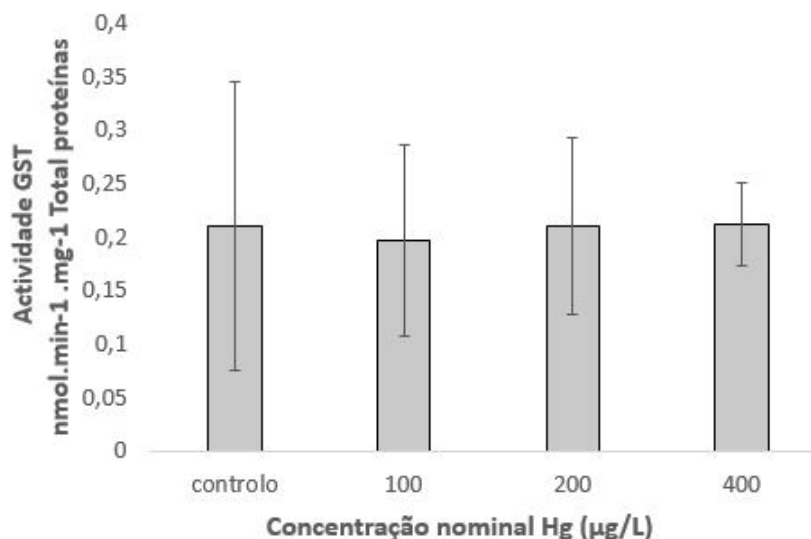


Figura 5.13: Comparação dos diferentes níveis da atividade da GST comparativamente ao grupo de controle e os expostos ao Hg para *Danio rerio*.

5.5.1.2 CAT

Relativamente à atividade da CAT, observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) entre os controles e os grupos expostos (100 µg/L e 200 µg/L) o que poderá indicar algum stress oxidativo. Os resultados da análise estatística encontram-se no anexo F. Os resultados da atividade desta enzima sugerem uma tendência da diminuição da atividade da CAT comparativamente ao grupo de controle (5.14). Isto pode significar uma inibição da atividade da CAT, evidenciando os efeitos da exposição a níveis elevados de Hg que, por sua vez, provocaram stress oxidativo [64].

Firidin *et al.* [71] observaram um aumento da atividade da CAT em tilápia (*Oreochromis niloticus*) expostos a diferentes concentrações de Hg e diferentes períodos de exposição (7 dias e 14 dias).

Por outro lado, o estudo de Cruz *et al.* [72] revelou a diminuição da atividade da CAT em larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*) expostos a HgCl₂, indicando os efeitos causados pelo Hg, tal como se observou no presente estudo.

No estudo de Kong *et al.* [73] também ocorreu inibição da atividade da CAT por ação da exposição de Hg em peixes dourado (*Carassius auratus*), sugerindo que esta enzima é sensível à exposição deste elemento, apoiando os resultados obtidos no presente trabalho. Com efeito, a diminuição da atividade da CAT não permite a eliminação do H₂O₂, podendo este desequilibrar a produção e eliminação de ROS. A produção excessiva de H₂O₂ pode provocar stress oxidativo e como consequência peroxidação lipídica.

De um modo geral, as respostas antioxidantes apresentaram alguma variabilidade com a acumulação de Hg, o que pode ser explicado principalmente pela tendência à inibição (evidente na CAT). Contudo, a resposta à CAT respondeu melhor aos efeitos da exposição ao Hg, tal como se observou nos estudos desenvolvidos por Mieiro *et al.* [74].

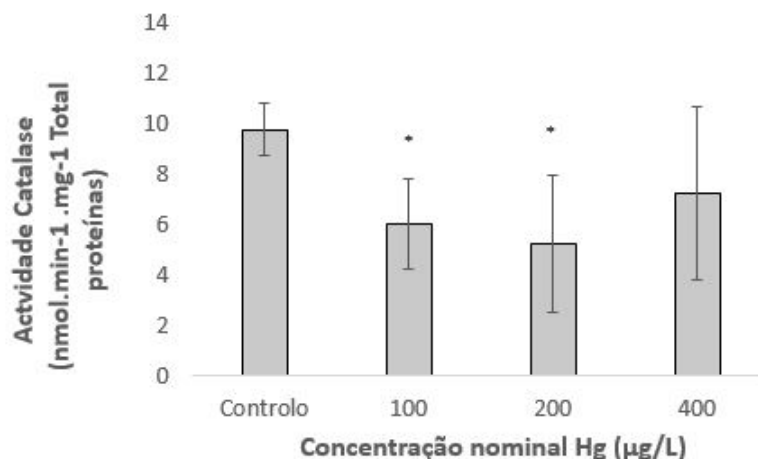


Figura 5.14: Comparação dos diferentes níveis da atividade da CAT comparativamente ao grupo de controlo e os expostos ao Hg para *Danio rerio*. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em relação aos grupos expostos a 100 µg/L e 200 µg/L em relação ao grupo de controlo.

5.5.2 Peroxidação Lipídica

Na figura 5.15 encontram-se representados os dados obtidos para a concentração de MDA que, como referido na secção 2.3.2, é um composto muito sensível ao dano oxidativo nas células. Não ocorreram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0.05$) entre o grupo de controlo e os expostos. Contudo, os resultados da análise estatística (anexo F) mostraram existir diferenças entre os grupos expostos a 100 µg/L e 400 µg/L e entre os grupos expostos a 200 µg/L e 400 µg/L. A concentração de MDA tem tendência a diminuir em relação ao grupo de controlo, à exceção do grupo exposto a 100 µg/L, não se podendo concluir acerca dos danos ocorridos nas membranas celulares.

No estudo de Huang *et al.* [70] não ocorreram diferenças nos níveis de MDA em larvas de solha Japonesa (*Paralichthys olivaceus*) expostos a HgCl₂. No entanto, ocorreu um aumento na concentração de MDA nos juvenis. De um modo geral, pode ocorrer neutralização de ROS, devido à exposição ao Hg, ao induzir a atividade das enzimas antioxidantes.

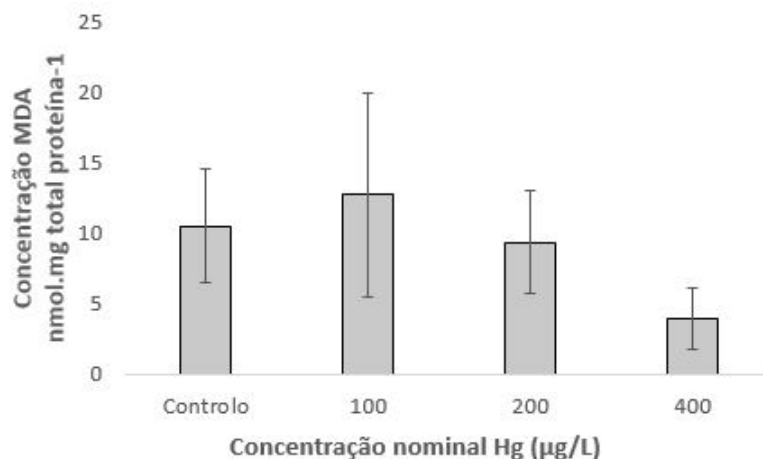


Figura 5.15: Comparação dos diferentes níveis de concentração de MDA comparativamente ao grupo de controlo e os expostos ao Hg para *Danio rerio*.

5.5.3 VTG

De forma a ser possível estudar a influência do sexo nos resultados obtidos por μ -EDXRF, procedeu-se à análise dos níveis de VTG determinados de modo a poder-se distinguir machos de fêmeas. No grupo de controlo não se encontrou nenhum macho analisado, o grupo exposto a 100 $\mu\text{g/L}$ é maioritariamente constituído por fêmeas, enquanto que tanto o de 200 $\mu\text{g/L}$ e o de 400 $\mu\text{g/L}$ por machos, tal como se observa na tabela 5.2.

É de salientar que os peixes foram colocados aleatoriamente nos tanques de estudo.

Tabela 5.2: Percentagem de fêmeas e machos nos diferentes grupos estudados.

Concentrações nominais ($\mu\text{g/L}$)	Fêmeas	Machos
0	100%	0%
100	78%	22%
200	22%	78%
400	17%	83%

5.5.3.1 Diferenças da exposição do Hg entre machos e fêmeas

Existem diferenças significativas ($p < 0.05$) entre machos e fêmeas na expressão desta proteína, tal como se observa na figura 5.16. Kohn *et al.* [75] mostraram que o método utilizado apresenta um nível considerado satisfatório em termos de precisão em relação à identificação dos sexos de Hapuku (*Polyprion oxygeneios*).

Relativamente às fêmeas, não ocorrem diferenças significativas ($p > 0.05$) entre o grupo de controlo e os restantes. Assim, os resultados sugerem que no presente estudo o Hg não

atuou como um desregulador endócrino. No entanto, estes apresentam uma tendência para diminuir comparativamente ao grupo de controlo, como se observa na figura 5.16.

Estudos desenvolvidos por Yao *et al.* [76] mostraram que a produção de VTG em fêmeas de peixe dourado (*Carassius auratus*), diminuiu com a exposição a HgCl_2 , tal como se observou no presente estudo.

Em relação aos machos e, uma vez que no grupo de controlo estes não estavam presentes, não é possível concluir se o Hg atuou ou não como desregulador endócrino.

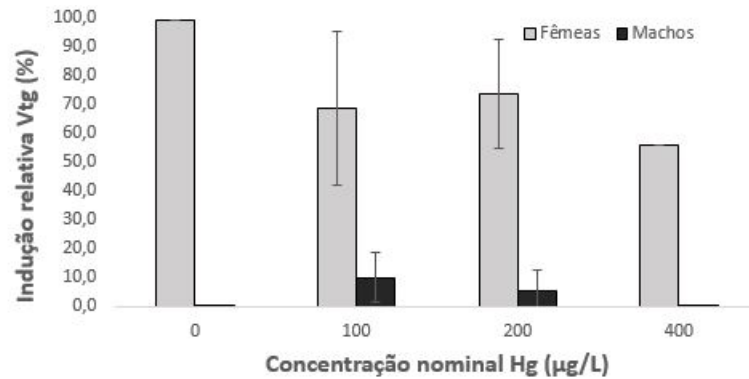


Figura 5.16: Influência do Hg como desregulador endócrino para *Danio rerio*.

CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

Com este estudo pretendeu-se obter informações sobre o processo de bioacumulação de Hg, através da análise da deposição deste elemento no organismo do peixe-zebra (*Danio rerio*).

As amostras estudadas foram analisadas pelas técnicas EDXRF com geometria triaxial, μ -EDXRF e ICP-AES. Os resultados obtidos por μ -EDXRF foram extremamente importantes, possibilitando a obtenção de informação qualitativa através das imagens dos mapeamentos e assim definir os tecidos alvos de acumulação preferencial de Hg. Observou-se um padrão comum na distribuição de Hg, ou seja, independentemente da concentração de Hg nominal na água, a distribuição elementar qualitativa é semelhante para todas as amostras analisadas. Conclui-se que os tecidos para os quais o Hg apresenta uma afinidade superior são as brânquias, o cérebro e a área visceral, ou seja, o intestino, fígado e gónadas.

Relativamente aos dados quantitativos obtidos, não é possível comparar os de μ -EDXRF com as restantes técnicas, uma vez que nesta última procedeu-se a um estudo por tecidos alvos, enquanto que nas restantes analisou-se a distribuição de Hg no peixe todo.

Da análise da concentração de Hg nos tecidos alvos através de μ -EDXRF é possível concluir que o Hg apresenta uma afinidade superior para a área visceral relativamente ao cérebro e às brânquias. Este fato está em concordância com as imagens de mapeamento obtidas, uma vez que ocorre maior deposição nessa área, e de acordo com a literatura. O tecido alvo onde a bioacumulação registou ser menor foi no cérebro. Ocorre deposição principalmente na barreira hematoencefálica, o que vai de acordo com a literatura, uma vez que os sais de Hg (neste caso HgCl_2) não são capazes de atravessar a mesma. De entre todos os grupos estudados, o grupo exposto a uma concentração nominal de 200 $\mu\text{g/L}$ apresenta valores de bioacumulação superiores.

Ao comparar a técnica de EDXRF com geometria triaxial e a técnica de ICP-AES,

é possível concluir que o grupo de controlo não apresenta Hg. Em ambas as técnicas são notórios os reduzidos valores de bioacumulação de Hg no grupo exposto a 100 $\mu\text{g/L}$ comparativamente aos restantes. A técnica de ICP-AES mostra que os valores de concentração de Hg entre os grupos expostos a 200 $\mu\text{g/L}$ e 400 $\mu\text{g/L}$ não possuem variações significativas, contrariamente ao observado na técnica de EDXRF com geometria triaxial. Esta variação poderá ser justificada pelos diferentes limites de deteção das duas técnicas e pelo número limitado de amostras analisadas pela técnica de ICP-AES, ou seja, o peso estatístico desta última foi inferior ao da técnica de EDXRF com geometria triaxial. Contudo, a técnica de ICP-AES apresenta a grande desvantagem de ser necessário a destruição das amostras para análise.

Do estudo enzimático e de entre todas as enzimas analisadas, a CAT é a enzima que apresenta os níveis de atividade mais significativos, indicando algum stress oxidativo essencialmente nos peixes intoxicados com 100 $\mu\text{g/L}$ e 200 $\mu\text{g/L}$. Através dos resultados obtidos por peroxidação lipídica não é possível concluir que ocorreram danos nas membranas celulares, apesar de ocorrerem diferenças para os controlos.

Todos os resultados apresentam uma certa variabilidade intrínseca dependendo de vários fatores como a variabilidade intraespecífica, o sexo, o património genético e a condição fisiológica.

Seria interessante num trabalho futuro obter informações sobre a especiação química do Hg, uma vez que a toxicidade deste elemento está associado à mesma, ou seja, ao estado de oxidação. Relativamente a este estudo e, tendo em conta as diferenças entre as concentrações nominais de Hg na água comparativamente às concentrações reais, seria importante estudar com mais detalhe os diferentes mecanismos de perda de Hg, bem como tentar reduzir os mesmos e assim otimizar os resultados obtidos. Além disso poder-se-ia aumentar o número de amostras estudadas de forma a obter-se uma análise estatística mais fidedigna.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. Castro-González e M Méndez-Armenta. "Heavy metals: Implications associated to fish consumption". Em: *Environmental toxicology and pharmacology* 26.3 (2008), pp. 263–271.
- [2] P. Govind e S Madhuri. "Heavy metals causing toxicity in animals and fishes". Em: *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences* 2.2 (2014), pp. 17–23.
- [3] S. Bose-O'Reilly, K. M. McCarty, N. Steckling e B. Lettmeier. "Mercury exposure and children's health". Em: *Current problems in pediatric and adolescent health care* 40.8 (2010), pp. 186–215.
- [4] X. Liu, Q. Song, Y. Tang, W. Li, J. Xu, J. Wu, F. Wang e P. C. Brookes. "Human health risk assessment of heavy metals in soil–vegetable system: a multi-medium analysis". Em: *Science of the Total Environment* 463 (2013), pp. 530–540.
- [5] W. H. Organization et al. "Ten chemicals of major public health concern". Em: *Geneva: WHO* (2015).
- [6] G Budak, I Aslan, A Karabulut e E Tıraşoğlu. "Analysis of some elements in three Chrysolina (Coleoptera, Chrysomelidae) species by EDXRF spectrometry". Em: *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 101.2 (2006), pp. 195–200.
- [7] K. S. A. Aldroobi, A Shukri, S. Bauk, E. M. A. Munem e A. M. Abuarra. "Determination of arsenic and mercury level in scalp hair from a selected population in Penang, Malaysia using XRF technique". Em: *Radiation Physics and Chemistry* 91 (2013), pp. 9–14.
- [8] M. Carvalho, T Magalhaes, M Becker e A Von Bohlen. "Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE". Em: *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62.9 (2007), pp. 1004–1011.
- [9] D. Medaković, T. Dolenec, D. Karlović, P. Vrhovnik, N. Rogan Šmuc, S. Rončević, L. Pitarević-Svedružić e M. Dolenec. "Trace metals in fish biominerals as environmental indicators: handheld XRF analyses". Em: *Key Engineering Materials*. Vol. 672. Trans Tech Publ. 2015, pp. 328–339.
- [10] G. Kari, U. Rodeck e A. P. Dicker. "Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery". Em: *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 82.1 (2007), pp. 70–80.

- [11] B. Sharma, S. Singh e N. J. Siddiqi. "Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems". Em: *BioMed research international* 2014 (2014).
- [12] J.-D. Park e W. Zheng. "Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury". Em: *Journal of Preventive Medicine and Public Health* 45.6 (2012), pp. 344–352.
- [13] P. O. Ozuah. "Mercury poisoning". Em: *Current problems in pediatrics* 30.3 (2000), pp. 91–99.
- [14] S. L. Shah e A. ALTINDAĞ. "Effects of Heavy Metal Accumulation on the 96-h LC₅₀ Values in Tench *Tinca tinca* L., 1758". Em: *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29.1 (2005), pp. 139–144.
- [15] J. C. Clifton. "Mercury exposure and public health". Em: *Pediatric Clinics of North America* 54.2 (2007), 237–e1.
- [16] J. Risher. "Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects". Em: *Concise International Chemical Assessment Document* (2003).
- [17] K. M. Rice, E. M. Walker, M. Wu, C. Gillette e E. R. Blough. "Environmental mercury and its toxic effects". Em: *Journal of preventive medicine and public health* 47.2 (2014), pp. 74–83.
- [18] P Holmes, K. James e L. Levy. "Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health?" Em: *Science of the total environment* 408.2 (2009), pp. 171–182.
- [19] H. Segner. "Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption". Em: *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149.2 (2009), pp. 187–195.
- [20] J. Goldsmith e C. Jobin. "Think small: zebrafish as a model system of human pathology". Em: *BioMed Research International* 2012 (2012).
- [21] P. McGrath e C.-Q. Li. "Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity". Em: *Drug discovery today* 13.9 (2008), pp. 394–401.
- [22] S.-H. Seok, M.-W. Baek, H.-Y. Lee, D.-J. Kim, Y.-R. Na, K.-J. Noh, S.-H. Park, H.-K. Lee, B.-H. Lee e J.-H. Park. "In vivo alternative testing with zebrafish in ecotoxicology". Em: *Journal of veterinary science* 9.4 (2008), pp. 351–357.
- [23] W. Busch, K. Duis, M. Fenske, G. Maack, J. Legler, S. Padilla, U. Strähle, H. Witters e S. Scholz. "The zebrafish embryo model in toxicology and teratology, September 2–3, 2010, Karlsruhe, Germany". Em: *Reproductive Toxicology* 31.4 (2011), pp. 585–588.
- [24] Z. I. N. (ZFIN). *The Zebrafish International Resource Center, University of Oregon, Eugene*. URL: <http://zfin.org> (acedido em 15/09/2016).

- [25] M. Hosseini, S. M. B. Nabavi, Y. Parsa e R. A. Ardashir. "Mercury accumulation in selected tissues of shrimp *Penaeus merguensis* from Musa estuary, Persian Gulf: variations related to sex, size, and season". Em: *Environmental monitoring and assessment* 186.9 (2014), pp. 5439–5446.
- [26] Y. Wei, J. Zhang, D. Zhang, T. Tu e L. Luo. "Metal concentrations in various fish organs of different fish species from Poyang Lake, China". Em: *Ecotoxicology and environmental safety* 104 (2014), pp. 182–188.
- [27] F. Gil e A. Pla. "Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure". Em: *Journal of applied toxicology* 21.4 (2001), pp. 245–255.
- [28] C. Vinagre, D. Madeira, V. Mendonça, M. Dias, J. Roma e M. S. Diniz. "Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the Rock goby, *Gobius paganellus*". Em: *Marine environmental research* 97 (2014), pp. 10–14.
- [29] D. Madeira, V. Mendonça, C. Vinagre e M. S. Diniz. "Is the stress response affected by season? Clues from an in situ study with a key intertidal shrimp". Em: *Marine Biology* 163.2 (2016), pp. 1–12.
- [30] Y. Sun, Y. Yin, J. Zhang, H. Yu, X. Wang, J. Wu e Y. Xue. "Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver, exposed to pyrene". Em: *Ecotoxicology and environmental safety* 71.2 (2008), pp. 446–453.
- [31] P. C. Huber, W. P. Almeida e Â. d. Fátima. "Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes". Em: *Química Nova* 31.5 (2008), pp. 1170–1179.
- [32] S. Aldrich. *Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit*. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/cs0410bul.pdf> (acedido em 18/08/2016).
- [33] M. Uchiyama e M. Mihara. "Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test". Em: *Analytical biochemistry* 86.1 (1978), pp. 271–278.
- [34] T. B. de Jesus e C. E. V. de Carvalho. "Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg)". Em: *Oecologia brasiliensis* 12.4 (2008), p. 7.
- [35] M. Diniz, I. Peres e J. Pihan. "Comparative study of the estrogenic responses of mirror carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated municipal sewage effluent (Lisbon) during two periods in different seasons". Em: *Science of the total environment* 349.1 (2005), pp. 129–139.
- [36] P. Brouwer. "Theory of XRF". Em: *Almelo, Netherlands: PANalytical BV* (2006).
- [37] W. C. Röntgen. "On a new kind of rays". Em: *Science* (1896), pp. 227–231.
- [38] B. Corporation. URL: <https://www.bruker.com/pt> (acedido em 06/08/2016).

- [39] J. E. Turner. *Atoms, Radiation and Radiation Protection*. ISBN 978-3-527-40606-7. Wiley - VHC, 2007.
- [40] M Guerra, M Manso, S Pessanha, A Le Gac, S Longelin, A Guilherme, M Gil, A. Seruya e M. Carvalho. *X-Ray Fluorescence Spectrometry as a Diagnostic Tool in Characterization and Conservation of Manueline Illuminated Manuscripts*. Ed. by Piero Frediani Nova Science Publishers, New York, 2013, pp. 235–256.
- [41] M. A. M. Guerra. “Development of a portable EDXRF Spectrometer with a secondary target in a tri-axial geometry”. Em: *EXRS2016 - European Conference on X-Ray Spectrometry*. 2016.
- [42] V. F. Nascimento Filho. “Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e por reflexão total (TXRF)”. Em: *Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz* (1999).
- [43] E. P. Bertin. *Principles and practice of X-ray spectrometric analysis*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [44] T. Almeida. “Estudo da distribuição de elementos vestigiais em tecidos humanos saudáveis e com carcinoma por espectroscopia de raios-X”. Tese de doutoramento. Faculdade Ciências Tecnologia, Universidade de Lisboa, 2007.
- [45] R. Jenkins. *X-ray fluorescence spectrometry*. Vol. 152. Wiley, 1988, 1932.
- [46] D. Guimarães. “Measurement of lead concentration in biological tissues by atomic spectroscopy techniques”. Tese de doutoramento. Faculdade Ciências Tecnologia, UNL, 2011.
- [47] M Guerra, M Manso, S Pessanha, S Longelin e M. Carvalho. “Theoretical and experimental study on the angular dependence of scattering processes in X-ray fluorescence systems”. Em: *X-Ray Spectrometry* 42.5 (2013), pp. 402–407.
- [48] D. Papadopoulou, G. Zachariadis, A. Anthemidis, N. Tsirliganis e J. Stratis. “Development and optimisation of a portable micro-XRF method for in situ multi-element analysis of ancient ceramics”. Em: *Talanta* 68.5 (2006), pp. 1692–1699.
- [49] K. Champion e R. Whitem. “Utilization of Increased Sensitivity of X-ray Fluorescence Spectrometry due to Polarization of the Background Radiation”. Em: (1963).
- [50] L. Hajji, A. Boukir, J. Assouik, S. Pessanha, J. L. Figueirinhas e M. L. Carvalho. “Artificial aging paper to assess long-term effects of conservative treatment. Monitoring by infrared spectroscopy (ATR-FTIR), X-ray diffraction (XRD), and energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF)”. Em: *Microchemical Journal* 124 (2016), pp. 646–656.
- [51] S. Pessanha, M. Carvalho, M. L. Carvalho e A. Dias. “Quantitative analysis of human remains from 18 th–19 th centuries using X-ray fluorescence techniques: The mysterious high content of mercury in hair”. Em: *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 33 (2016), pp. 26–30.

- [52] S. Pessanha, M. Costa, M. I. Oliveira, M. E. M. Jorge e M. L. Carvalho. "Nondestructive analysis of Portuguese "dinheiros" using XRF: overcoming patina constraints". Em: *Applied Physics A* 119.3 (2015), pp. 1173–1178.
- [53] D. Guimarães, M. L. Carvalho, V. Geraldés, I. Rocha e J. P. Santos. "Study of lead accumulation in bones of Wistar rats by X-ray fluorescence analysis: aging effect". Em: *Metallomics* 4.1 (2012), pp. 66–71.
- [54] M.-L. Carvalho, M. Manso, S. Pessanha, A. Guilherme e F. R. Ferreira. "Quantification of mercury in XVIII century books by Energy Dispersive X-Ray Fluorescence (EDXRF)". Em: *Journal of Cultural Heritage* 10.3 (2009), pp. 435–438.
- [55] I. L. of marine radioactivity. "Fish flesh homogenate, Certificate of analysis". Em: *International Atomic Energy Agency* (1986).
- [56] R. Alvarez. "Oyster Tissue, Standard Reference Material 1566". Em: *National Bureau of Standards* (1983).
- [57] R. M. Rousseau. "Detection limit and estimate of uncertainty of analytical XRF results". Em: *The Rigaku Journal* 18.2 (2001), pp. 33–47.
- [58] I. Ramos. "Estudo da Concentração Elementar em Tecidos Biológicos: Trigo e Eucalipto". Tese de mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, UNL, 2015.
- [59] M. M. Bradford. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Em: *Analytical biochemistry* 72.1-2 (1976), pp. 248–254.
- [60] W. H. Habig, M. J. Pabst e W. B. Jakoby. "Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation". Em: *Journal of biological Chemistry* 249.22 (1974), pp. 7130–7139.
- [61] D. Madeira, C. Vinagre e M. S. Diniz. "Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*". Em: *Ecological Indicators* 63 (2016), pp. 324–331.
- [62] L. H. Johansson e L. H. Borg. "A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples". Em: *Analytical biochemistry* 174.1 (1988), pp. 331–336.
- [63] N. D. Denslow, M. C. Chow, K. J. Kroll e L. Green. "Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics". Em: *Ecotoxicology* 8.5 (1999), pp. 385–398.
- [64] I. C. Souza, I. D. Duarte, N. Q. Pimentel, L. D. Rocha, M. Morozesk, M. M. Bonomo, V. C. Azevedo, C. D. Pereira, M. V. Monferrán, C. R. Milanez et al. "Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries". Em: *Environmental pollution* 180 (2013), pp. 136–144.

- [65] C. O. Ribeiro, J. Guimaraes e W. Pfeiffer. "Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*)". Em: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34.2 (1996), pp. 190–195.
- [66] K. Elahee e S Bhagwant. "Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius". Em: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68.3 (2007), pp. 361–371.
- [67] A. C. Elia, R. Galarini, M. I. Taticchi, A. J. M. Dörr e L. Mantilacci. "Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure". Em: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55.2 (2003), pp. 162–167.
- [68] D. A. Monteiro, F. T. Rantin e A. L. Kalinin. "Dietary intake of inorganic mercury: bioaccumulation and oxidative stress parameters in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*". Em: *Ecotoxicology* 22.3 (2013), pp. 446–456.
- [69] L. Vieira, C Gravato, A. Soares, F Morgado e L Guilhermino. "Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour". Em: *Chemosphere* 76.10 (2009), pp. 1416–1427.
- [70] W. Huang, L. Cao, Z. Ye, X. Yin e S. Dou. "Antioxidative responses and bioaccumulation in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic mercury exposure". Em: *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 152.1 (2010), pp. 99–106.
- [71] G. Firidin, F. Kargın, Ö. Fırat, H. Y. Çoğun, Ö. Fırat, B. Firidin e T. A. Yüzereroğlu. "Antioxidant defense system, lipid peroxidation and acetylcholinesterase activity of *Oreochromis niloticus* exposed to mercury and mercury + selenium". Em: *Fresenius Environmental Bulletin* (2015).
- [72] F. F. Cruz, C. E. Leite, T. C. B. Pereira, M. R. Bogo, C. D. Bonan, A. M. O. Battastini, M. M. Campos e F. B. Morrone. "Assessment of mercury chloride-induced toxicity and the relevance of P2X7 receptor activation in zebrafish larvae". Em: *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 158.3 (2013), pp. 159–164.
- [73] X. Kong, S. Wang, H. Jiang, G. Nie e X. Li. "Responses of acid/alkaline phosphatase, lysozyme, and catalase activities and lipid peroxidation to mercury exposure during the embryonic development of goldfish *Carassius auratus*". Em: *Aquatic toxicology* 120 (2012), pp. 119–125.
- [74] C. Mieiro, A. Duarte, M. Pereira e M Pacheco. "Mercury accumulation patterns and biochemical endpoints in wild fish (*Liza aurata*): a multi-organ approach". Em: *Ecotoxicology and environmental safety* 74.8 (2011), pp. 2225–2232.
- [75] Y. Y. Kohn, P. M. Lokman, A. Kilimnik e J. E. Symonds. "Sex identification in captive hapuku (*Polyprion oxygeneios*) using ultrasound imagery and plasma levels of vitellogenin and sex steroids". Em: *Aquaculture* 384 (2013), pp. 87–93.

- [76] D. Kime. *Endocrine disruption in fish*. ISBN 978-1-4615-4943-7. Springer Science+Business Media, LLC, 1998.



VALORES ASSOCIADOS ÀS AMOSTRAS DE PEIXE-ZEBRA

Tabela A.1: Dados *D. rerio* do grupo de controle.

<i>Danio rerio</i>	Controlo		
	Peso congelado (g \pm 0,01)	Peso seco (g \pm 0,01)	Tamanho (mm \pm 0,05 mm)
1	0,14	0,03	27,10
2	0,34	0,09	33,60
3	0,31	0,07	29,60
4	0,18	0,04	29,40
5	0,06	0,01	19,10
6	0,20	0,05	25,00
7	0,24	0,06	29,70

Tabela A.2: Dados *D. rerio* do grupo exposto à concentração nominal 100 μ g/L.

<i>Danio rerio</i>	100 μ g/L		
	Peso congelado (g \pm 0,01)	Peso seco (g \pm 0,01)	Tamanho (mm \pm 0,05 mm)
1	0,19	0,04	28,10
2	0,25	0,07	32,80
3	0,21	0,05	30,90
4	0,24	0,06	32,50
5	0,17	0,04	20,40
6	0,21	0,05	30,10
7	0,19	0,05	21,00
8	0,18	0,04	31,20
9	0,32	0,08	31,60

Tabela A.3: Dados *D. rerio* do grupo exposto à concentração nominal 200 µg/L.

<i>Danio rerio</i>	200 µg/L		
	Peso congelado (g ± 0,01)	Peso seco (g ± 0,01)	Tamanho (mm ± 0,05 mm)
1	0,13	0,02	29,80
2	0,34	0,09	31,10
3	0,13	0,04	24,50
4	0,18	0,03	31,10
5	0,10	0,02	22,40
6	0,19	0,05	27,20
7	0,14	0,03	33,00
8	0,16	0,04	22,70
9	0,13	0,04	26,20

Tabela A.4: Dados *D. rerio* do grupo exposto à concentração nominal 400 µg/L.

<i>Danio rerio</i>	400 µg/L		
	Peso congelado (g ± 0,01)	Peso seco (g ± 0,01)	Tamanho (mm ± 0,05 mm)
2	0,22	0,06	27,60
3	0,16	0,04	30,00
5	0,20	0,03	32,60
6	0,23	0,06	28,50
7	0,23	0,06	31,00
8	0,13	0,03	27,40

Tabela A.5: Taxa de mortalidade para o grupo de controlo e para cada concentração testada.

Concentração (µg/L)	Controlo	100	200	400
Indivíduos	9	9	9	9
Total mortos	0	0	0	3
Mortalidade (%)	0	0	0	33,3

VALORES ASSOCIADOS À TÉCNICA DE EDXRF COM GEOMETRIA TRIAXIAL

Tabela B.1: Dados associados à concentração elementar média obtida para os vários elementos presentes nas amostras de 100 $\mu\text{g/L}$ e 200 $\mu\text{g/L}$.

Elementos	100 ($\mu\text{g/L}$)	200 ($\mu\text{g/L}$)
P	3100 \pm 14000	30000 \pm 20000
Cl	3800 \pm 1800	2800 \pm 1400
K	13000 \pm 5000	11000 \pm 3000
Ca	17000 \pm 8000	21000 \pm 11000
Fe	80 \pm 50	60 \pm 40
Zn	190 \pm 60	190 \pm 50
Sr	40 \pm 16	60 \pm 40
Hg	20 \pm 12	50 \pm 9

APÊNDICE B. VALORES ASSOCIADOS À TÉCNICA DE EDXRF COM GEOMETRIA TRIAXIAL

Tabela B.2: Dados associados à concentração elementar média obtida para os vários elementos presentes nas amostras de 400 $\mu\text{g/L}$ e controlo.

Elementos	400 ($\mu\text{g/L}$)	0 ($\mu\text{g/L}$)
P	28000 \pm 6000	29000 \pm 11000
Cl	2800 \pm 900	4200 \pm 1800
K	14000 \pm 3000	14100 \pm 5000
Ca	17000 \pm 3200	15000 \pm 6000
Fe	70 \pm 40	120 \pm 70
Zn	180 \pm 30	170 \pm 50
Sr	30 \pm 9	40 \pm 11
Hg	30 \pm 11	ALD

ALD: abaixo do limite de deteção.



VALORES ASSOCIADOS À TÉCNICA DE μ -EDXRF

Tabela C.1: Dados associados à concentração elementar média de Hg obtida em função dos tecidos alvos (área visceral, brânquias e cérebro).

	Área Visceral ($\mu\text{g/g}$)	Brânquias ($\mu\text{g/g}$)	Cérebro ($\mu\text{g/g}$)
100 ($\mu\text{g/g}$)	150 ± 60	50 ± 18	10 ± 8
200 ($\mu\text{g/g}$)	260 ± 90	200 ± 60	190 ± 80
400 ($\mu\text{g/g}$)	120 ± 40	80 ± 30	50 ± 30

Tabela C.2: Dados associados à concentração elementar média de Hg obtida em função dos tecidos alvos (área visceral, brânquias e cérebro) e do sexo.

	Área Visceral ($\mu\text{g/g}$)	Brânquias ($\mu\text{g/g}$)	Cérebro ($\mu\text{g/g}$)
100 fêmeas ($\mu\text{g/g}$)	150 ± 60	40 ± 20	10 ± 7
100 machos ($\mu\text{g/g}$)	180 ± 60	70 ± 20	0 ± 0
200 fêmeas ($\mu\text{g/g}$)	310 ± 90	150 ± 20	210 ± 90
200 machos ($\mu\text{g/g}$)	250 ± 90	300 ± 60	170 ± 60
400 fêmeas ($\mu\text{g/g}$)	140 ± 7	90 ± 30	60 ± 30
400 machos ($\mu\text{g/g}$)	110 ± 40	70 ± 30	40 ± 30

VALORES ASSOCIADOS À TÉCNICA DE ICP-AES

Tabela D.1: Dados associados à concentração elementar média de Hg obtida para os diferentes grupos estudados (100 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$, 400 $\mu\text{g/L}$ e controlo).

Concentração de Hg nominal ($\mu\text{g/L}$)	Concentração de Hg elementar ($\mu\text{g/g}$)
0 (controlo)	ALD
100	8 ± 2
200	20 ± 4
400	20 ± 5

ALD: abaixo do limite de deteção.

Tabela D.2: Dados associados à reta de calibração de Hg para baixas concentrações.

Intensidade	Concentração (mg/l)
100954	0,000
154649	0,005
208616	0,010
419894	0,025
759738	0,050
1110347	0,075
1433056	0,100

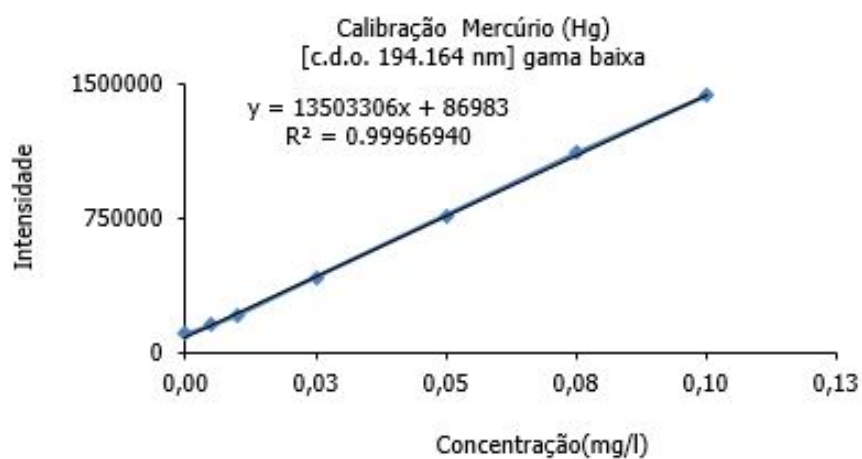


Figura D.1: Reta utilizada para efeitos de calibração para o Hg de baixas concentrações.

Tabela D.3: Dados associados à reta de calibração de Hg para altas concentrações.

Intensidade	Concentração (mg/l)
100954	0,00
759738	0,05
1433056	0,10
3569565	0,25
7558841	0,50
11422452	0,75
14785963	1,00

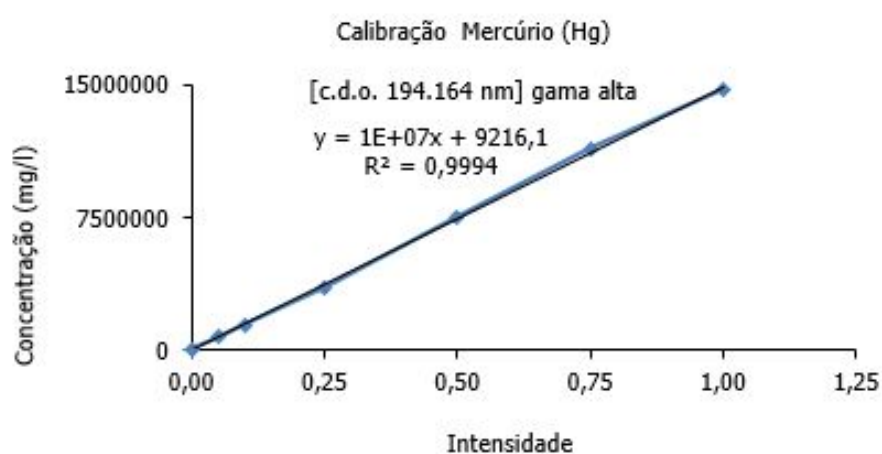


Figura D.2: Reta utilizada para efeitos de calibração para o Hg de altas concentrações.

VALORES ASSOCIADOS AO ESTUDO ENZIMÁTICO

Tabela E.1: Dados dos diferentes níveis da atividade da CAT para os diferentes grupos estudados (100 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$, 400 $\mu\text{g/L}$ e controle). Os resultados são apresentados na forma de atividade CAT \pm desvio padrão.

Concentração de Hg nominal ($\mu\text{g/L}$)	Atividade CAT (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ Total proteínas)
0 (controle)	10 \pm 2
100	6 \pm 2
200	5 \pm 3
400	7 \pm 4

Tabela E.2: Dados dos diferentes níveis da atividade da GST para os diferentes grupos estudados (100 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$, 400 $\mu\text{g/L}$ e controle). Os resultados são apresentados na forma de atividade GST \pm desvio padrão.

Concentração de Hg nominal ($\mu\text{g/L}$)	Atividade GST (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ Total proteínas)
0 (controle)	0.2 \pm 0.2
100	0.2 \pm 0.1
200	0.2 \pm 0.1
400	0.2 \pm 0.1

Tabela E.3: Dados dos diferentes níveis de peroxidação lipídica para os diferentes grupos estudados (100 µg/L, 200 µg/L, 400 µg/L e controle). Os resultados são apresentados na forma de concentração MDA ± desvio padrão.

Concentração de Hg nominal (µg/L)	Concentração MDA (nmol.mg total proteína-1)
0 (controle)	10 ± 5
100	20 ± 8
200	9 ± 4
400	4 ± 3

Tabela E.4: Dados da influência do Hg como desregulador endócrino para os diferentes grupos estudados (100 µg/L, 200 µg/L, 400 µg/L e controle). Os resultados são apresentados na forma de indução VTG ± desvio padrão.

Concentração de Hg nominal (µg/L)	Indução relativa Vtg (%)
0 (controle) fêmeas	100 ± 5
0 (controle) machos	0
100 fêmeas	70 ± 30
100 machos	10 ± 9
200 fêmeas	80 ± 20
200 machos	5 ± 8
400 fêmeas	60 ± 0
400 machos	0

VALORES ASSOCIADOS À ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tabela F.1: Dados associados à análise estatística (teste não paramétrico U de Mann-Whitney) realizada para a GST. Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) encontram-se marcados com um asterisco (*).

GST	100 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$
Controlo	0.64	0.683	0.425
100 $\mu\text{g/L}$		0.630	0.266
200 $\mu\text{g/L}$	0.630		0.366
400 $\mu\text{g/L}$	0.266	0.366	

Tabela F.2: Dados associados à análise estatística (teste não paramétrico U de Mann-Whitney) realizada para CAT. Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) encontram-se marcados com um asterisco (*).

Catalase	100 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$
Controlo	0.025*	0.041*	0.197
100 $\mu\text{g/L}$		0.529	0.519
200 $\mu\text{g/L}$	0.529		0.366
400 $\mu\text{g/L}$	0.519	0.366	

Tabela F.3: Dados associados à análise estatística (teste não paramétrico U de Mann-Whitney) realizada para peroxidação lipídica. Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) encontram-se marcados com um asterisco (*).

LPO	100 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$
Controlo	0.794	1.000	0.245
100 $\mu\text{g/L}$		0.564	0.019*
200 $\mu\text{g/L}$	0.564		0.009*
400 $\mu\text{g/L}$	0.019*	0.009*	

Tabela F.4: Dados associados à análise estatística (teste não paramétrico U de Mann-Whitney) realizada para a VTG. Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) encontram-se marcados com um asterisco (*).

VTG	100 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$
Controlo	0.644	0.166	0.048
100 $\mu\text{g/L}$		0.027*	0.008*
200 $\mu\text{g/L}$	0.027*		0.231
400 $\mu\text{g/L}$	0.008*	0.231	

Tabela F.5: Dados associados à análise estatística (teste não paramétrico U de Mann-Whitney) realizada para a VTG-Fêmeas. Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) encontram-se marcados com um asterisco (*).

VTG-Fêmeas	100 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$
Controlo	0.414	1.000	0.564
100 $\mu\text{g/L}$		0.349	0.602
200 $\mu\text{g/L}$	0.349		0.643
400 $\mu\text{g/L}$	0.602	0.643	

Tabela F.6: Dados associados à análise estatística (teste não paramétrico de U Mann-Whitney) realizada para a VTG-Machos. Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) encontram-se marcados com um asterisco (*).

VTG-Machos	100 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$
Controlo	0.858	0.874	0.393
100 $\mu\text{g/L}$		0.609	1.000
200 $\mu\text{g/L}$	0.609		0.317
400 $\mu\text{g/L}$	1.000	0.317	

Tabela F.7: Dados associados à análise estatística (teste não paramétrico de U Mann-Whitney) realizada para ICP-AES. Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) encontram-se marcados com um asterisco (*).

ICP-AES	100 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$
Controlo	0.028*	0.028*	0.037*
100 $\mu\text{g/L}$		0.021*	0.034*
200 $\mu\text{g/L}$	0.021*		0.289
400 $\mu\text{g/L}$	0.034*	0.289	

Tabela F.8: Dados associados à análise estatística (teste não paramétrico de U Mann-Whitney) realizada para μ -EDXRF em relação à área visceral. Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) encontram-se marcados com um asterisco (*).

A.V.	100 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$
100 $\mu\text{g/L}$		0.034*	0.873
200 $\mu\text{g/L}$	0.034*		0.005
400 $\mu\text{g/L}$	0.873	0.005*	

Tabela F.9: Dados associados à análise estatística (teste não paramétrico de U Mann-Whitney) realizada para μ -EDXRF em relação às brônquias. Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) encontram-se marcados com um asterisco (*).

A.V.	100 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$
100 $\mu\text{g/L}$		0.001*	0.149
200 $\mu\text{g/L}$	0.001*		0.003*
400 $\mu\text{g/L}$	0.149	0.003*	

Tabela F.10: Dados associados à análise estatística (teste não paramétrico de U Mann-Whitney) realizada para μ -EDXRF em relação ao cérebro. Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) encontram-se marcados com um asterisco (*).

A.V.	100 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$
100 $\mu\text{g/L}$		0.001*	0.077
200 $\mu\text{g/L}$	0.001*		0.003*
400 $\mu\text{g/L}$	0.077	0.003*	

EXPOSIÇÕES DO TRABALHO

Poster submetido e aceite na conferência Heavy Metals 2016 realizada na FCT-UNL, entre os dias 21 e 22 Março.

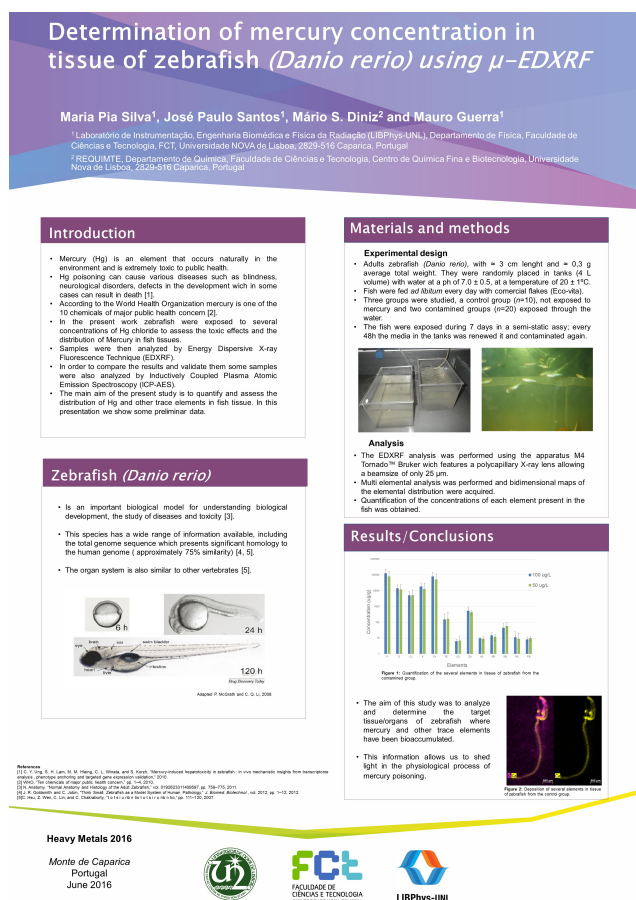


Figura G.1: Poster científico apresentado na conferência Heavy Metals 2016.

Poster submetido e aceite no 1st Biomedical Engineering Workshop 2016 realizada na FCT-UNL, entre os dias 19 e 20 Maio.

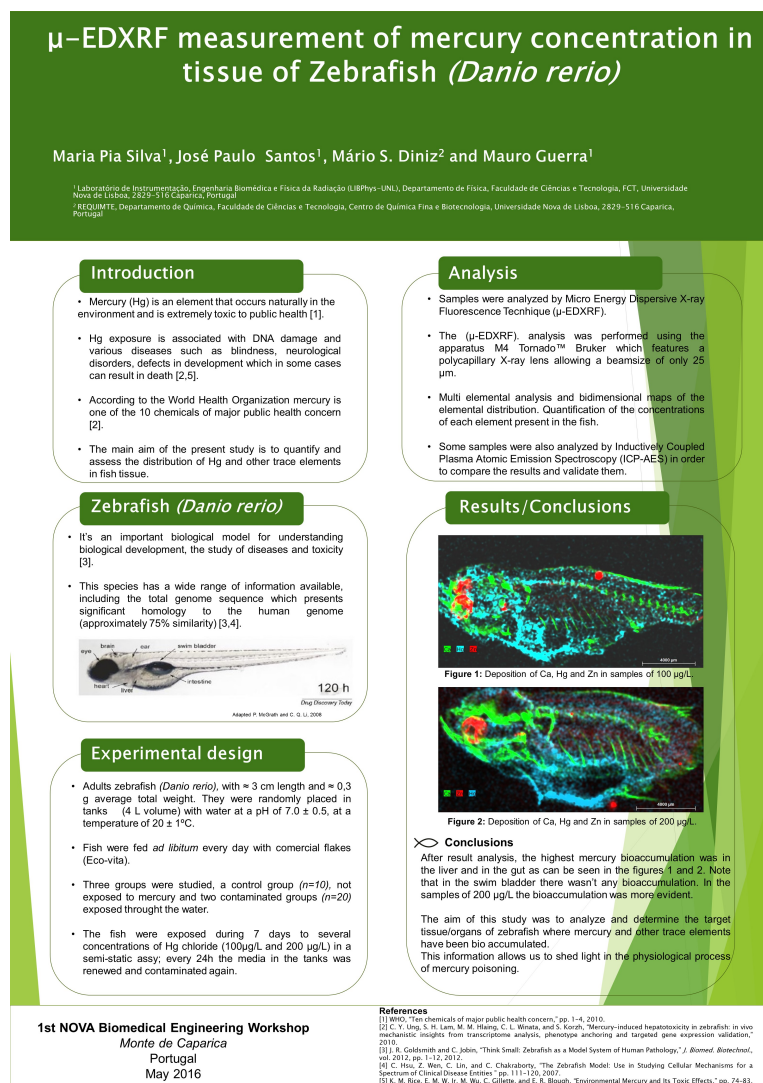


Figura G.2: Poster científico apresentado no 1st Biomedical Engineering Workshop 2016.

Poster submetido e aceite na conferência EXRS-2016 realizada em Gotemburgo (Suécia),
entre os dias 19 e 24 Junho.

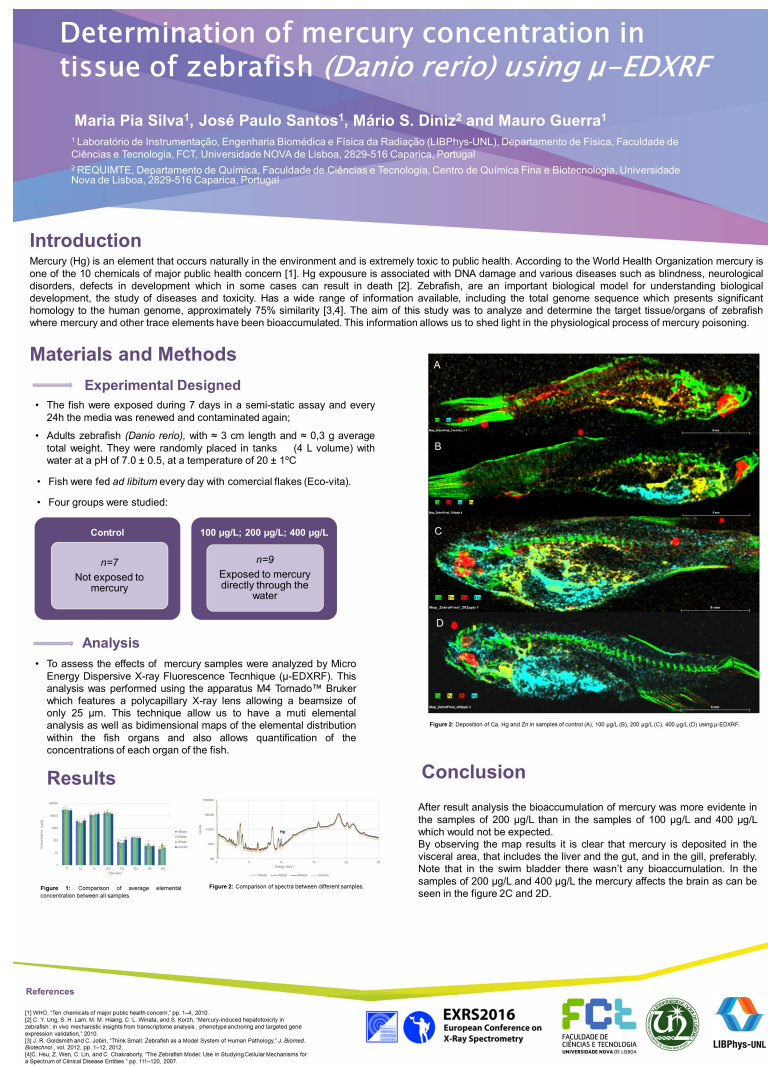


Figura G.3: Poster científico apresentado na conferência EXRS 2016.